THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Neurosciences

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé CBS2

Unité de recherche : Pathophysiologie de la transmission synaptique
Institut de Génomique Fonctionnelle - UMR 5203 CNRS – U 1191 INSERM

EFFETS DES AGENTS ANESTHÉSIQUES SUR LE CERVEAU EN DÉVELOPPEMENT

-

CARTOGRAPHIE ET CARACTÉRISATION DE L'APOPTOSE INDUITE PAR LE SEVOFLURANE SUR CERVEAU ENTIER DE SOURIS.

Présentée par Chrystelle SOLA
Le 17 octobre 2024

Sous la direction de Julie PERROY
et Christophe DADURE

Devant le jury composé de

Etienne AUDINAT, Directeur de Recherche, CNRS	Président du Jury
Nada SABOURDIN, Praticien Hospitalier-Professeure des Université, Université de Paris Sorbonne	Rapportrice
Souhayl DAHMANI, Praticien Hospitalier-Professeur des Université, Université de Paris Cité	Rapporteur
Corinne LEJUS-BOURDEAU, Praticien Hospitalier-Professeure des Université, Université de Nantes	Examinatrice
Christophe DADURE, Praticien Hospitalier-Professeur des Université, Université de Montpellier	Co-directeur de thèse
Julie PERROY, Directeur de Recherche, CNRS	Directrice de thèse
Vivien SZABO, Chef de Clinique – Chercheur, Université de Montpellier	Invité

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

" Si l'on considérait une théorie comme parfaite et si l'on cessait de la vérifier par l'expérience scientifique, elle deviendrait une doctrine "

Claude Bernard

" Tout ce que je sais, c'est que je ne sais rien."

Socrate

" Le bonheur est souvent la seule chose qu'on puisse donner sans l'avoir et c'est en le donnant qu'on l'acquiert."

Voltaire

A tous les patients, petits et grands….

Puis-je être à la hauteur de l'estime que je vous porte.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ ..... **- 1 -**

ABSTRACT ..... **- 2 -**

ABRÉVIATIONS ..... **- 3 -**

LISTE DES FIGURES ..... **- 4 -**

LISTE DES IMAGES ..... **- 6 -**

I INTRODUCTION ..... **- 7 -**

A. ANESTHÉSIE GÉNÉRALE : CONTEXTE CLINIQUE ..... - 8 -

1. Épidémiologie en pédiatrie ..... *- 8 -*

2. Sécurité et anesthésie ..... *- 10 -*

3. L'enfant n'est pas un « petit » adulte ..... *- 12 -*

a) Particularité de l'anesthésie pédiatrique ..... - 14 -

b) Implication pour la pratique de l'anesthésie pédiatrique au XXIème siècle ..... - 17 -

2. Neurotoxicité potentielle des anesthésiques généraux ..... *- 20 -*

a) De nouvelles interrogations … ..... - 20 -

b) Les données cliniques ..... - 22 -

B. LES AGENTS MÉDICAMENTEUX DE L'ANESTHÉSIE GÉNÉRALE ..... - 33 -

1. Un peu d'histoire … ..... *- 33 -*

a) Naissance de l'anesthésie « chirurgicale » ..... - 33 -

b) L'anesthésie dite « moderne » ..... - 38 -

c) L'anesthésie générale au XXIème siècle ..... - 40 -

2. Mécanismes d'action supposés des agents anesthésiques ..... *- 43 -*

a) Théorie unitaire non spécifique : ..... - 43 -

b) Cibles moléculaires des agents anesthésiques inhalés ..... - 46 -

c) De la synapse à un état de conscience altéré … ? ..... - 51 -

C. APOPTOSE, NEURODÉVELOPPEMENT ET ANESTHÉSIE ..... - 54 -

1. Mort cellulaire physiologique ..... *- 55 -*

2. Balance excitation / inhibition ..... *- 57 -*

3. Neurotoxicité et agents anesthésiques : données expérimentales ..... *- 59 -*

II OBJECTIFS DE LA THÈSE ..... **- 67 -**

III MÉTHODOLOGIE ..... **- 69 -**

A. MODÈLE ANIMAL MURIN ..... - 70 -

B. PROTOCOLE EXPÉRIMENTALE : ANESTHÉSIE ..... - 70 -

C. MÉTHODE I-DISCO+ SUR CERVEAUX ENTIERS DE SOURIS ..... - 72 -

1. Pré-traitement des tissus ..... *- 73 -*

2. Immunomarquage ..... *- 74 -*

3. Transparisation ..... *- 74 -*

4. Imagerie 3D des cerveaux entiers de souris transparisés ..... *- 75 -*

a) Traitement des images tridimensionnelles ..... - 77 -

b) Développement de l'atlas du cerveau de souris à P7 ..... - 78 -

c) Analyse des images tridimensionnelles ..... - 80 -

D. IMMUNOHISTOCHIMIE SUR TRANCHE DE CERVEAU ..... - 81 -

1. Préparation des tissus ..... *- 81 -*

2. Immunomarquage ..... *- 81 -*

3. Immunohistochimie ..... *- 82 -*

4. Imagerie microscopique sur tranches de cerveau ..... *- 82 -*

E. ANALYSES STATISTIQUES ..... - 84 -

IV RÉSULTATS ..... - 85 -

A. CARTOGRAPHIE ET QUANTIFICATION SUR CERVEAU ENTIER DE L'APOPTOSE INDUITE PAR L'ANESTHÉSIE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT CÉRÉBRAL POSTNATAL ..... - 85 -
B. DISTRIBUTION ANATOMIQUE DE L'APOPTOSE INDUITE PAR L'ANESTHÉSIE EN PÉRIODE NÉONATALE ..... - 89 -
C. DISTRIBUTION SPATIALE INTRA-CORTICALE DES CELLULES APOPTOTIQUES DU NÉOCORTEX EN PÉRIODE NÉONATALE ..... - 91 -
D. CARACTÉRISATION HISTOLOGIQUE DES CELLULES APOPTOTIQUES DU NÉOCORTEX EN PÉRIODE NÉONATALE ..... - 95 -

V DISCUSSION ..... - 97 -

A. MÉTHODOLOGIE I-DISCO+ ..... - 99 -
B. VULNÉRABILITÉ DE LA PÉRIODE NÉONATALE ..... - 100 -
C. VULNÉRABILITÉ DU NÉOCORTEX ..... - 101 -
D. APOPTOSE DÉVELOPPEMENTALE ET APOPTOSE INDUITE PAR LE SÉVOFLURANE ..... - 103 -
E. MÉCANISMES CELLULAIRES DE L'APOPTOSE INDUITE PAR LE SÉVOFLURANE ..... - 108 -
F. IMPLICATION DE LA BALANCE EXCITATION / INHIBITION ..... - 112 -
G. CONSÉQUENCES POTENTIELLES À LONG TERME ..... - 119 -

VI PERSPECTIVES ET CONCLUSION ..... - 122 -

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... - 132 -

ANNEXES ..... - 146 -

ANNEXE 1 : PUBLICATION ..... - 147 -
ANNEXE 2 : PROTOCOLE I-DISCO+ (2) ..... - 156 -
ANNEXE 3 : IMAGERIE DE BIOSENSEURS SUR CULTURES PRIMAIRES DE NEURONES ..... - 157 -
ANNEXE 4 : IMAGERIE DE BIOSENSEURS SUR TRANCHE DE CERVEAUX ..... - 158 -

RÉSUMÉ

Chaque année, des millions d'enfants ont recours à une intervention chirurgicale ou un acte diagnostique réalisés sous anesthésie générale. Si les bénéfices de l'action réversible des agents anesthésiques ne peuvent aujourd'hui être remis en cause, leur impact à long terme, notamment sur le développement cérébral, est source de nombreuses préoccupations. Au cours des deux dernières décennies, des inquiétudes concernant la sécurité de l'anesthésie générale sont nées d'études expérimentales rapportant une mort diffuse des cellules cérébrales associée à des troubles neurocognitifs après exposition à la plupart des agents anesthésiques utilisés en clinique et sur différents modèles animaux, allant du nématode au primate. Bien qu'il fût longtemps supposé qu'une mort cellulaire accrue au niveau de certaines zones cérébrales puisse expliquer les déficiences neurocognitives observées, aucune preuve d'un tel lien de causalité n'a pu être établie à ce jour.

Ce projet de thèse avait pour objectif d'établir une cartographie tridimensionnelle exhaustive de l'apoptose induite par l'exposition au sévoflurane sur le cerveau entier de souris au cours de son développement. Pour ce faire, nous avons appliqué une technique émergente de clarification des tissus, couplée à l'imagerie en trois dimensions (i-DISCO - three-dimensional imaging of solvent-cleared organs). Cette première étape nous a permis d'identifier les zones les plus affectées par l'exposition au sévoflurane. Guidés par cette cartographie, nous avons alors précisé la distribution anatomique des lésions et effectué une caractérisation immuno-cytochimique des cellules apoptotiques.

Sur des cerveaux entiers de souris, nous avons constaté une augmentation significative de la coloration de la caspase-3 clivée chez les animaux exposés au sévoflurane en période néonatale. En revanche, aucune différence du marquage de la caspase-3 clivée n'a été retrouvée chez les animaux exposés en périodes juvénile ou adulte. La création d'un atlas du cerveau néonatal nous a permis de préciser que le néocortex était la zone la plus touchée, suivie par le striatum et le métencéphale. Au niveau du cortex, cette apoptose n'était pas homogène mais suivait des gradients inter- et intra-corticaux. La caractérisation histologique a révélé que 70 % des cellules apoptotiques étaient des neurones post-mitotiques dont un quart étaient GABAergiques.

La période néonatale est ainsi apparue comme une fenêtre étroite de susceptibilité à l'apoptose induite par le sévoflurane. Les lésions impliquaient principalement le néocortex tandis que nous n'avons mis en évidence aucun dommage significatif au niveau de l'hippocampe. L'identification de gradients inter-corticaux et intra-laminaires pourraient traduire les spécificités temporo-spatiales de la maturation différentielle d'aires corticales fonctionnellement distinctes.

Cette cartographie exhaustive de l'apoptose induite par l'exposition précoce à une anesthésie au sévoflurane représente une voie de recherche prometteuse vers une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents et la recherche de stratégies neuroprotectrices permettant de réduire l'impact des conséquences potentielles de l'exposition précoce à une anesthésie générale.

ABSTRACT

Every year, millions of children undergo surgical or diagnostic procedures performed under general anesthesia. While the benefits of the reversible action of anesthetic agents cannot be questioned today, their long-term impact, particularly on brain development, remains a significant concern. Over the past two decades, safety issues regarding general anesthesia have arisen from experimental studies reporting widespread brain cell death associated with neurocognitive impairments after exposure to most clinically used anesthetic agents across various animal models, ranging from nematodes to non-human primates. Although it was long assumed that increased cell death in specific brain regions might explain observed neurocognitive deficits, no conclusive evidence of such a causal link has been established to date.

This thesis project was designed to establish an exhaustive three-dimensional mapping of apoptosis induced by sevoflurane exposure in the whole mouse brain during its development. For that purpose, we applied an emerging tissue clarification technique coupled with three-dimensional imaging (i-DISCO - three-dimensional imaging of solvent-cleared organs). This first step enabled us to identify the areas most affected by sevoflurane exposure. Guided by this mapping, we then specified the anatomical distribution of the lesions and conducted an immunocytochemical characterization of the apoptotic cells.

In whole mouse brains, we observed a significant increase in cleaved caspase-3 staining in animals exposed to sevoflurane during the neonatal period. However, no difference in cleaved caspase-3 labeling was found in animals exposed during juvenile or adult developmental stages. The creation of an atlas of the neonatal brain enabled us to specify that the neocortex was the area most affected, followed by the striatum and the metencephalon. In the cortex, this apoptosis was not homogeneous but followed inter- and intra-cortical gradients. Histological characterization revealed that 70% of the apoptotic cells were post-mitotic neurons, a quarter of which were GABAergic.

The neonatal period thus appeared to be a narrow window of susceptibility to sevoflurane-induced apoptosis. The lesions mainly involved the neocortex, while no significant damage was observed in the hippocampus. The identification of inter-cortical and intra-laminar gradients could reflect the temporo-spatial specificities of the differential maturation of functionally distinct cortical areas.

This anatomical mapping of apoptosis induced by early exposure to sevoflurane anesthesia represents a promising approach towards a better understanding of the underlying mechanisms and exploring neuroprotective strategies to mitigate the impact of the potential consequences of early exposure to general anesthesia.

ABRÉVIATIONS

AG : anesthésie générale

SNC : système nerveux central

AA : agents anesthésiques

FDA : Food and Drug Administration : administration américaine chargée de la surveillance, l'innocuité, l'efficacité et la sécurité des médicaments

TDAH : troubles déficitaires de l'attention avec ou sans hyperréactivité

TSA : troubles du spectre autistique

QI : quotient intellectuelle évalué par un test psychométrique évaluant les fonctions cognitives globales

N_2O : protoxyde d'azote

GABA : acide γ-aminobutyrique

R-$GABA_A$: récepteur de l'acide γ-aminobutyrique GABA de type A

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

R-NMDA : récepteur glutamatergique de type N-méthyl-D-aspartate

R-nACh : récepteur nicotinique de l'acétylcholine

E/I : excitation/inhibition

c-caspase-3 : caspase 3 clivée, marqueur d'apoptose

i-DISCO+ : immunolabeling-enabled three-dimensional imaging of solvent-cleared organs – technique permettant l'imagerie de tissus ou organes transparisés et immunomarqués

3D : tridimensionnelle

P7 - P21 - P49 : 7ième - 21ième - 49ième jours de vie de la souris

DMSO : diméthylsulfoxyde

PBS : tampon de phosphate de sodium

DBE : di benzyle éther

MAP Kinase : protéines kinases activées par les mitogènes

ERK1/2 : kinases régulées par un signal extracellulaire

NKCC1 : cotransporteurs Sodium Potassium Chlore de type 1

KCC2 : cotransporteurs Potassium Chlore de type 2

AMPc/PKA : voie de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et de la protéine kinase A (PKA)

LISTE DES FIGURES

Figure 1 *: Ordre de grandeur du risque d'accident catastrophique dans les activités humaines.*

Figure 2 *: Incidence relative des événements critiques sévères respiratoires et cardiovasculaires (%) per-opératoires et distribution relative des quatre événements critiques respiratoires majeurs (%) en anesthésie pédiatrique.*

Figure 3 *: Liste des médicaments anesthésiques et sédatifs concernés par l'alerte de la FDA.*

Figure 4 *: Représentation graphique des résultats pour chaque domaine d'évaluation cognitivo-comportemental.*

Figure 5 *: Chronologie des principales découvertes de médicaments d'anesthésie.*

Figure 6 *: les différentes composantes et sites d'action supposés des agents anesthésiques inhalés.*

Figure 7 *: Les théories unitaires du mode d'action des anesthésiques.*

Figure 8 *: Principales cibles supposées des anesthésiques inhalés et leurs effets sur les canaux ioniques.*

Figure 9 *: Cartographie de l'apoptose dans l'ensemble du cerveau après une anesthésie au sévoflurane.*

A. Exemples d'images de fluorescence de l'immunomarquage de la c-caspase-3 dans le cerveau de souris après exposition ou non au sévoflurane à P7.

B. Exemples d'images de fluorescence de l'immunomarquage de la c-caspase-3 dans le cerveau de souris après exposition au sévoflurane à P7, P21 et P49.

C. Quantification des volumes d'immunomarquage de la c-caspase-3 dans le cerveau entier.

Figure 11 *: Distribution spatiale de l'apoptose néocorticale après anesthésie au sévoflurane à P7.*

A. Gradients anatomiques de la fraction volumique de c-caspase-3 selon l'axe antéro-postérieur, n = 10.

B. Gradients anatomiques de la fraction volumique de c-caspase-3 selon l'axe ventro-dorsal, n = 10.

Figure 12 *: Distribution intra-corticale de l'apoptose après anesthésie au sévoflurane à P7.*

A. Exemples d'images de fluorescence acquises dans le néocortex montrant la distribution intra-corticale des cellules positives à la c-caspase-3.

B. Quantification de la distribution intra-corticale des cellules positives à la c-caspase-3

Figure 13 *: Caractérisation de l'apoptose néocorticale après anesthésie au sévoflurane à P7.*

A. Exemples d'images de fluorescence acquises après immunomarquage pour la caractérisation intra-corticale des cellules positives à la c-caspase-3.

B. Quantification de la fraction des cellules corticales co-marquées avec la c-caspase-3, n = 65 (gauche), 41 (droite).

Figure 14 *: Aperçu des voies de signalisation supposées de la neuro apoptose développementale associée au sévoflurane.*

Figure 15 *: Mécanismes supposés de la neurotoxicité induite par une exposition précoce aux agents anesthésiques et les possibles conséquences sur le développement neurocognitif.*

Figure 16 *: Switch de l'action du GABA au cours du développement.*

Figure 17 *: Exemple des facteurs de risque significatifs pour le trouble déficitaire de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH) chez l'enfant au cours du développement précoce.*

LISTE DES IMAGES

Image 1 *: Journée de l'éther (1846). Première démonstration publique réussie d'une anesthésie à l'éther.*

Image 2 *: Anesthésie à l'éther.*

Image 3 *: Inhalateur d'Ombrédanne crée en 1908.*

Image 4 *: Méthode i-DISCO+ (immunolabeling-enabled three-dimensional imaging of solvent-cleared organs) : cerveaux entiers de souris avant et après transparisation.*

Image 5 *: Principe de la microscopie à feuille de lumière.*

Image 6 *: Poste d'imagerie - Cerveaux entiers de souris P7 transparisés et immunomarqués prêts à être imagés.*

Image 7 *: Processus de développement de l'atlas 3D utilisé pour la segmentation anatomique des cerveaux P7.*

Image 8 *: Régions cérébrales définies lors du développement de l'atlas au stade de développement P7.*

I INTRODUCTION

Chaque année, des millions de personnes ont besoin d'une intervention chirurgicale ou un acte diagnostique imposant la réalisation d'une anesthésie générale (AG). L'objectif principal de cette anesthésie est la suspension temporaire et réversible de la conscience et repose sur l'association 1/ hypnose (ou narcose) 2/ amnésie et 3/ immobilité à laquelle vient s'ajouter le contrôle du retentissement neurovégétatif des stimuli nociceptifs incluant une composante analgésique. L'AG offre ainsi la possibilité de réaliser des interventions chirurgicales ou des procédures hautement invasives sans mémorisation ni douleur. Cela implique nécessairement une action interférant sur le fonctionnement normal du système nerveux central (SNC), notamment en modulant la transmission synaptique et l'activité électrique neuronale.

A. ANESTHÉSIE GÉNÉRALE : CONTEXTE CLINIQUE

1. ÉPIDÉMIOLOGIE EN PÉDIATRIE

L'anesthésie de l'enfant est courante dans la pratique clinique quotidienne des anesthésistes, mais il y a étonnamment peu d'informations concernant l'épidémiologie de ces procédures. La grande majorité des AG réalisées chez l'enfant s'inscrit dans le cadre d'une prise en charge chirurgicale (79%) ; la part des AG nécessaire pour permettre la réalisation de procédures diagnostiques dans des conditions acceptables pour le patient et optimales pour l'acquisition et l'interprétation des résultats est ainsi non négligeable (21%), ce qui contraste fortement avec la situation rencontrée chez les adultes. Aux États-Unis, selon les données les plus récentes de la National Health Interview Survey (NHIS), près de 3,9 millions interventions chirurgicales sont réalisées chaque année chez des patients âgés de 0 à 17 ans, parmi lesquels un tiers ont moins de 5 ans. Le nombre d'interventions chirurgicales annuelles est apparue relativement stable entre 2005 et 2018, et concernait environ 5 % des Américains de moins de 18 ans [1]. Ces données chirurgicales n'apportent cependant aucune donnée sur la prise en charge anesthésique. Une étude récente a analysé, sur une population géographiquement définie (Le comté d'Olmsted situé dans l'État du Minnesota), l'incidence des interventions nécessitant une AG avant le troisième anniversaire de l'enfant. La cohorte rétrospective des enfants nés entre 1994 et 2007 a inclus 20 922 enfants. Quinze pour cent de ces derniers ont eu besoin d'au moins une AG avant l'âge de 3 ans [2]. Les données françaises disponibles sont beaucoup plus limitées : au cours de l'année 2010, la base nationale du Programme de Médicalisation du Système d'Information (PMSI) rapportent un taux de 17,5 anesthésies pour

100 habitants, dont 6,4 pour 100 habitants de moins de 18 ans. Cela représente 933 736 anesthésies réalisée chez l'enfant (8,2 % du total des actes d'anesthésie réalisés en France). Parmi ces dernières, 22,5 % concernaient l'enfant de 1 à 3 ans, 3,8 % le moins d'un an et 0,9% le moins d'un mois [3,4.]. Ainsi, on estime globalement que, dans les pays développés, environ un enfant sur sept aura besoin d'au moins une AG avant l'âge de 4 ans [2,5].

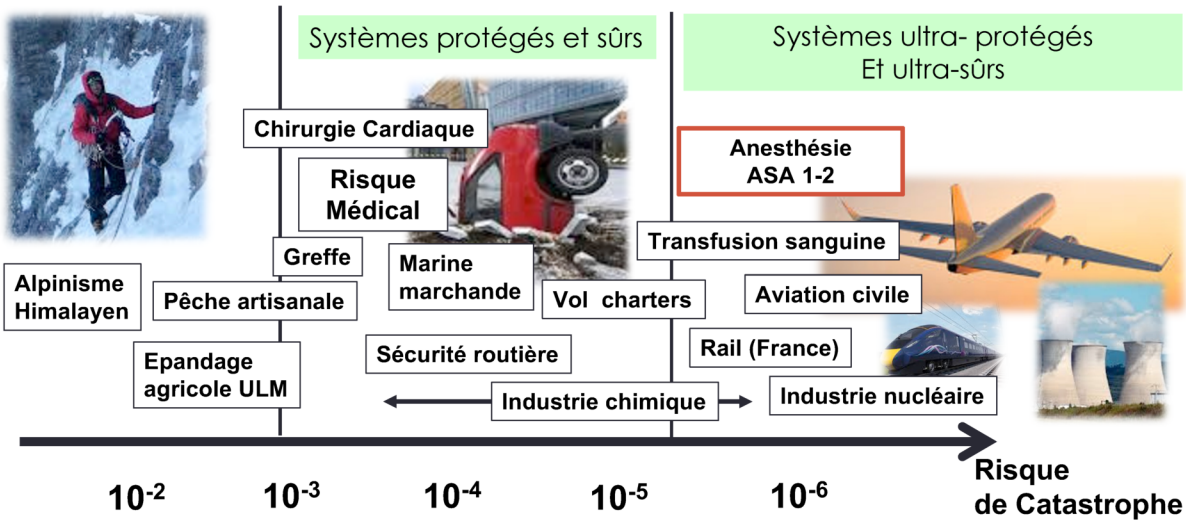
2. SÉCURITÉ ET ANESTHÉSIE

Il est aujourd'hui considéré que l'anesthésie est un systèmes ultra-sûr car très normé et encadré par des règles de fonctionnement hautement standardisées. Grâce à la mise en œuvre d'améliorations techniques, à l'introduction de normes pour le monitorage de base des patients (oxymétrie de pouls et capnographie), et à l'utilisation généralisée d'agents anesthésiques (AA) plus sûrs, le risque d'événements indésirables mortels durant une AG a été réduit de 90% au cours du dernier siècle : chez le patient en bonne santé, ce risque est aujourd'hui inférieur à 1 pour 100 000 AG. La prise en charge anesthésique a ainsi atteint un niveau de sécurité beaucoup plus élevé que la sécurité routière et comparable au risque des vols de l'aviation civile [6] (Figure 1).

En pédiatrie, le taux de mortalité globale lié à l'anesthésie a lui aussi considérablement diminué au cours du siècle actuel. Dans la plupart des pays industrialisés, l'anesthésie chez l'enfant de plus de 1 an en bonne santé a atteint un niveau de sécurité proche de celui de la population adulte [7]. Cependant, ces résultats sont à nuancer. D'une part, malheureusement, cette diminution de la mortalité per-opératoire n'est pas universelle : de récentes études issues de pays en voie de développement rapportent une mortalité bien plus élevée, pouvant attendre 7,4 pour 10 000 procédures, chez l'enfant ayant besoin d'une prise en charge chirurgicale [8–11]. D'autre part, chez l'enfant de moins de 6 mois et de moins de 1 mois, l'incidence de la mortalité per-opératoire est multipliée par 10 et 20 respectivement. Cette population est en effet parmi les plus fragiles, notamment en cas de comorbidités (cardiopathies

congénitales, syndromes poly-malformatifs, extrême prématurité, et autres maladies métaboliques...).

Figure 1 : Ordre de grandeur du risque d'accident catastrophique dans les activités humaines *(adapté de Pr René Amalberti – Conférence MURS 2010 et [6]).*



ASA : système de classification de l'état de santé physique. Il permet d'évaluer le risque anesthésique péri opératoire. ASA 1 : patient en bonne santé / ASA 2 patient atteint d'une maladie systémique légère sans retentissement fonctionnel

Retour au texte

3. L'ENFANT N'EST PAS UN « PETIT » ADULTE

L'enfant n'est pas un adulte « en miniature ». L'enfant est un être en développement tant sur le plan de la taille de ses organes que sur le plan de ses grandes fonctions physiologiques, psychoaffectives et comportementales.

Avant d'atteindre l'âge adulte, 4 grandes périodes de maturation fonctionnelles et psycho-intellectuelles vont s'opérer :

- la période néonatale (28 premiers jours de vie) caractérisée par l'adaptation à la vie extra-utérine et l'autonomisation des grandes fonctions vitales. C'est une période de modifications et de maturation intenses de l'organisme, permettant une transition entre la physiologie fœtale et la physiologie de l'enfant ;

- la période infantile (ou « nourrisson » – 1 mois à 1 ans révolu), dérivant étymologiquement du latin infans – *infantis* – signifiant « qui ne parle pas », caractérisée par une croissance rapide, la poursuite de la maturation des grandes fonctions vitales mais des moyens de communication avec le monde environnant encore très limités ;

- la période de l'enfance à proprement parler (3 ans – puberté) qui voit les particularités physiologiques s'estomper, les moyens de communication se développer mais une psychologie encore très éloignée de l'âge adulte ;

- enfin, l'adolescence caractérisée par la puberté, une morphologie et une maturation psycho-intellectuelle qui se rapprochent de celles de l'adulte mais encore proche de celles de l'enfance, notamment dans le contrôle de soi et la gestion des émotions.

Outre le développement et la maturation des grandes fonctions vitales, l'ensemble du corps est sous le contrôle du cerveau qui est responsable de la

réception des informations provenant de l'environnement, de leur traitement et de l'envoi des commandes vers les organes, les muscles et les glandes neuroendocrines. Au cours des 9 mois de gestation et des premières années de vie, la différenciation et la multiplication cellulaires produisent plus de 100 milliards de neurones qui établissent des milliards de connexions avec d'autres neurones qui sous-tendent toutes les pensées, émotions, actions et comportements humains [12]. À la naissance, le cerveau pèse environ 400 grammes, il va continuer à croitre sous l'effet de la synaptogenèse et de la myélinisation au fur et à mesure que se créent des réseaux neuronaux. La croissance est rapide durant les premières années de vie : le volume cérébral représente environ 35 % du volume adulte 2 à 3 semaines après la naissance ; il atteint environ 80 % de sa taille adulte à 2 ans et 95 % à 5 ans. Le développement cérébral se poursuit ensuite, plus lentement, jusqu'à l'âge adulte. Les étapes précoces du développement cérébral sont donc cruciales, notamment au cours la période allant de la naissance à l'âge de 2-3 ans, caractérisée par un développement cérébral rapide et dynamique qui joue un rôle important dans le développement cognitif futur [13].

L'anesthésie pédiatrique se caractérise ainsi par la prise en charge d'une population très large, allant du grand prématuré au jeune adulte. Les modifications liées à la croissance et la maturation observées de la naissance à l'âge adulte vont ainsi conditionner les particularités et spécificités de la prise en charge anesthésique de l'enfant.

a) PARTICULARITÉ DE L'ANESTHÉSIE PÉDIATRIQUE

Comme nous l'avons vu précédemment, la mortalité liée à l'anesthésie chez l'enfant de plus de un an en bonne santé est équivalente à celle de l'adulte sans comorbidité (1 cas sur 100 000). Cependant, malgré d'importants progrès en termes de qualité et de sécurité des soins, le taux d'incidents graves per-opératoire reste non négligeable en pédiatrie, et ce d'autant plus que l'enfant est jeune. L'incidence globalement très faible de la mortalité liée à l'anesthésie a ainsi conduit, au cours de la dernière décennie, la communauté médicale à mettre l'accent sur la réduction du risque de complications liées à l'anesthésie.

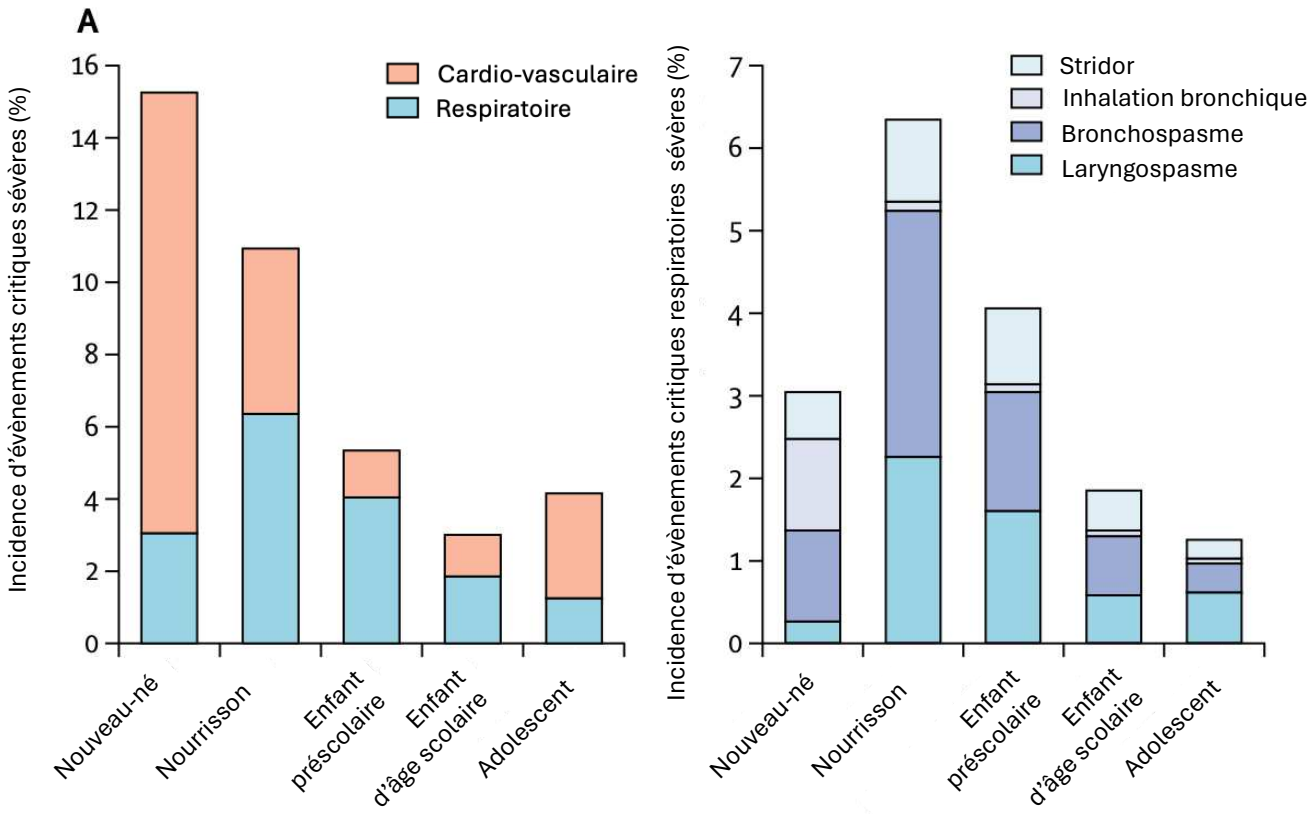
L'étude APRICOT (Anaesthesia PRactice In Children Observational Trial), avait pour objectif de mesurer et d'actualiser l'incidence et la nature des événements indésirables graves chez les enfants anesthésiés en Europe, ainsi que les facteurs de risque associés[14] : entre le 1er avril 2014 et le 31 janvier 2015, toutes les données des enfants (0 à 15 ans) admis pour une procédure anesthésique dans 261 centres de 33 pays européens ont été inclues de manière prospective. Le nombre total de complications graves rapportés pendant ou immédiatement après l'anesthésie était de 1637 sur 31 127 procédures analysées soit 5,3%. Les enfants les plus jeunes, de moins de 3 ans, et en particulier ceux de moins de 1 an, apparaissent comme une population à risque plus élevé. Les complications les plus fréquemment rapportées étaient liées aux voies respiratoires avec un risque significativement augmenté chez le moins de 3 ans. Ce risque diminuait de 11 % pour chaque année supplémentaire de l'enfant. Ce surrisque respiratoire du jeune enfant est lié à une réserve en oxygène plus faible associée à une consommation en oxygène plus élevée, une tendance accrue au collapsus des voies respiratoires

et une hyper-réactivité des réflexes respiratoires, toutes ces caractéristiques étant amplifiées sous anesthésie [15]. Les incidents cardiovasculaires rapportés dans l'étude APRICOT étaient quant à eux principalement décrits chez les nouveau-nés et les nourrissons (Figure 2). Cette population est en effet particulièrement vulnérable : si les grands systèmes organiques sont anatomiquement présents à la naissance, ils restent, au cours de cette période, fonctionnellement immatures. Les systèmes nerveux, cardiovasculaire et rénal, sont particulièrement sensibles aux modifications hémodynamiques, à l'hypoxémie et aux variations des autres constantes physiologiques (pression partielle en CO_2 sanguine, glycémie, natrémie, pH sanguin, température) qui peuvent survenir au cours d'une anesthésie. A cela viennent s'ajouter les effets dépresseurs des AA, alors même que les capacités d'adaptation cardio-vasculaire et respiratoire sont altérées voire abolies par l'AG. Ces résultats, comme ceux d'études antérieures [14,16,17], confirment que l'âge de l'enfant est ainsi l'un des principal facteurs de risque de complications graves per-opératoires.

Les autres facteurs de risque de complications graves per-opératoires étaient essentiellement associés à la présence de comorbidité et au caractère urgent (non programmé) de la prise en charge anesthésique. Enfin l'étude APRICOT rapportait une relation inverse entre l'incidence des complications per-opératoires et l'expérience pédiatrique de l'équipe d'anesthésie en charge de l'enfant : une pratique expérimentée de l'anesthésie pédiatrique réduisait l'incidence des événements critiques per-opératoires graves d'origine à la fois respiratoires (diminution de 1 % pour chaque année d'expérience) et cardiovasculaires (diminution de 2 % pour chaque année d'expérience) [14]. Ces

résultats soulignent et confirment la spécificité de la prise en charge anesthésique de l'enfant [14,17–19].

Figure 2 : Incidence relative des événements critiques sévères respiratoires et cardiovasculaires (%) per-opératoires et distribution relative des quatre événements critiques respiratoires majeurs (%) en anesthésie pédiatrique [14].



Retour texte

b) IMPLICATION POUR LA PRATIQUE DE L'ANESTHÉSIE PÉDIATRIQUE AU XXIÈME SIÈCLE

L'identification de cette population à risque, représentée par les enfants de moins de 3 ans, pose la question de définir un âge qui pourrait être considéré comme seuil pour l'orientation des enfants vers des centres disposant de compétences pédiatriques spécialisées. C'est l'objet d'un débat dans de nombreux pays européens et au sein des différentes sociétés savantes d'Anesthésie-Réanimation.

Aux États-Unis et au Canada notamment, l'anesthésie pédiatrique est une sur*s*pécialité nécessitant une formation diplômante. En Europe, la mise en place d'un cadre reconnu pour une formation commune et homogène en anesthésie pédiatrique est en cours. Une formation spécifique n'est actuellement mise en œuvre qu'au Royaume-Uni, dans les pays scandinaves et, depuis peu, en France. La pratique de l'anesthésie de l'enfant en France est guidée par un certain nombre de textes émanant de nos tutelles et de nos sociétés savantes [20,21]. Les dernières Recommandations de Pratiques Professionnelles en Anesthésie-Réanimation Pédiatrique, éditées par la Société Française d'Anesthésie-Réanimation Française (SFAR) et L'Association Des Anesthésistes-Réanimateurs Pédiatriques d'Expression Francophone (ADARPEF) en 2023, soutiennent que l' anesthésie d'un enfant, au même titre que toute autre anesthésie relativement spécialisée (greffe d'organe, chirurgie cardiaque, Neurochirurgie …) impose au praticien d'avoir une formation adéquate, un certain volume d'activité et une pratique régulière, lui permettant de maintenir ses compétences [22]. Au-delà d'équipes de soins spécialisée, un environnement organisationnel en capacité de fournir un

équipement approprié et un personnel suffisant et formé à la pédiatrie est nécessaire pour garantir la qualité et la sécurité des soins péri opératoires.

Les risques associés à l'anesthésie ont, comme nous l'avons vu précédemment, considérablement diminué au cours des 50 dernières années, notamment grâce à des normes de sécurité plus strictes, à de meilleurs systèmes de surveillance et grâce à des AA plus sûrs tels que le sévoflurane et le propofol [23]. Conséquence directe de ces progrès, la probabilité de complications et de décès induits par l'anesthésie est souvent négligée dans les interventions chirurgicales de routine chez des patients en bonne santé. Exceptée dans la population des moins de 1 an, la mortalité liée à l'anesthésie en chirurgie pédiatrique est aujourd'hui proche de celle de l'adulte en bonne santé. Par ailleurs, les complications immédiates de l'anesthésie dans l'enfance sont désormais bien identifiées. Cependant, il reste de nombreuses interrogations sur les effets à long terme de l'exposition à l'AG notamment sur le développement et le fonctionnement du SNC.

2. NEUROTOXICITÉ POTENTIELLE DES ANESTHÉSIQUES GÉNÉRAUX

a) DE NOUVELLES INTERROGATIONS …

Bien que l'anesthésie soit considérée aujourd'hui comme un système ultra-sûr, la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis a publié en 2016 une alerte de sécurité concernant l'utilisation d'anesthésiques généraux et d'agents sédatifs chez les jeunes enfants et les femmes enceintes [24]. Le fondement de cette alerte s'appuie en grande partie sur une vaste base de données issues d'études animales : l'exposition à des AA en période périnatale pendant plus de 3 heures entraînerait une perte généralisée de cellules cérébrales associée à des effets à long terme sur le comportement et/ou l'apprentissage des animaux. Les termes de cette alerte sont suffisamment explicites pour avoir suscité de fortes inquiétudes au sein de la communauté médicale et de vives réactions de la part des médias et de la population générale : « l'utilisation répétée ou prolongée d'anesthésiques généraux et de sédatifs au cours d'interventions chirurgicales ou de procédures diagnostiques chez les enfants de moins de trois ans ou chez les femmes enceintes au cours du troisième trimestre de grossesse peut affecter le développement du cerveau des enfants » [24,25]. La liste des agents médicamenteux incriminés inclut les AA les plus utilisés actuellement en pratique clinique tels que le sévoflurane, le propofol, la kétamine ou encore le midazolam (Figure 3).

Figure 3 : Liste des médicaments anesthésiques et sédatifs concernés par l'alerte de la FDA [25].

Selon l'alerte de la FDA « Cette liste comprend des médicaments anesthésiques et sédatifs qui diminuent l'activité des récepteur glutamatergique et/ou potentialisent l'activité GABAergique. Aucun médicament spécifique ne s'est avéré plus sûr qu'un autre ».

Dénomination commune international
desflurane
etomidate
halothane
isoflurane
ketamine *
lorazepam injection
methohexital
midazolam injection, sirop *
pentobarbital
propofol *
sevoflurane *

** médicaments les plus utilisés en anesthésie pédiatrique actuellement.*

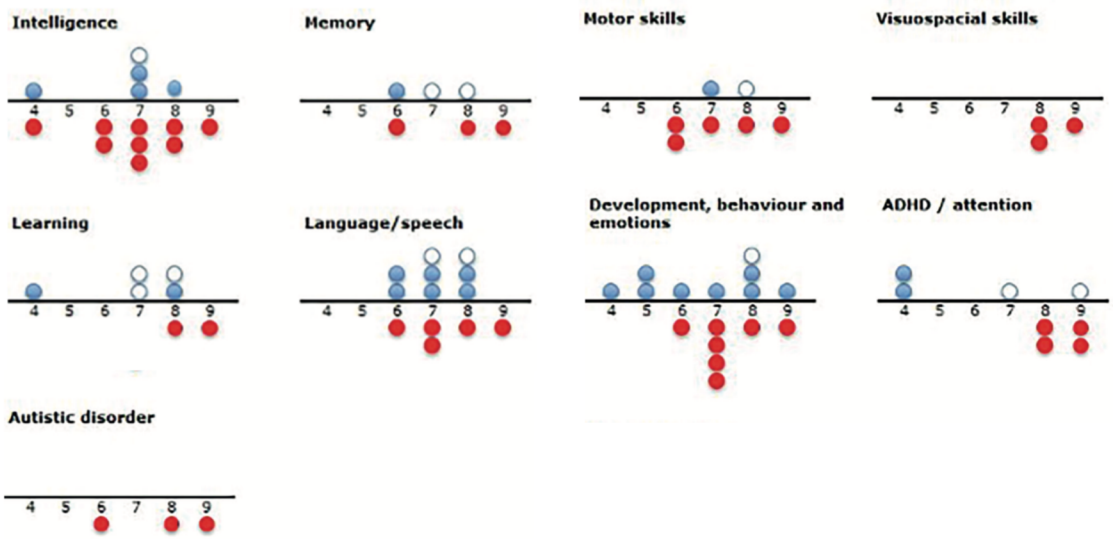
b) LES DONNÉES CLINIQUES

La question clinique qui s'impose suite à cette alerte de la FDA, est de savoir si l'exposition à des AA dans la petite enfance pourrait avoir des effets neurodéveloppementaux à long terme, comme cela a pu être rapporté chez l'animal [26–30]. Malheureusement, la conception d'études cliniques permettant d'évaluer la potentielle neurotoxicité de l'anesthésie s'avère extrêmement complexe et difficile pour de multiples raisons [31,32]. En premier lieu, il est difficile, presque impossible, de randomiser un enfant pour qu'il reçoive ou non une AG pour une intervention chirurgicale. D'autre part, cela nécessite de suivre les enfants pendant plusieurs années avec donc une longue période de latence, période requise pour permettre une évaluation neuro-cognitivo-comportementale adéquate capable de mettre en évidence d'éventuels troubles (si tant est que les outils d'évaluation clinique actuels soient adaptés). Étant donné la difficulté de réaliser des essais contrôlés randomisés ou toute autre étude prospective dans ce domaine, la plupart des données cliniques portant sur la neurotoxicité potentielle des AA sont issues d'études de cohorte de nature observationnelle, le plus souvent rétrospectives et/ou reposant sur des données collectées à d'autres fins. Cela comporte inévitablement une multitude de biais et de facteurs de confusion rendant leur interprétation extrêmement complexe.

Une revue de la littérature ayant été publiée entre 2009 et 2019 a inclus 26 études européennes ou nord-américaines : 25 étaient observationnelles et une, la seule publiée à ce jour, était de type randomisé contrôlé [33]. L'analyse a porté sur plus de 600 000 participants, 120 000 ayant été exposés à au moins une AG avant l'âge de 4 ans et 480 000 contrôles non exposés et appariés.

Les critères d'évaluations étaient les résultats neurodéveloppementaux, évalués au moins 6 mois après l'exposition à l'AG, sur les domaines cognitifs suivants : l'intelligence, la mémoire, l'apprentissage, le langage et la parole, les capacités visuospatiales, la fonction motrice, le comportement et les émotions, les troubles déficitaires de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH), ainsi que les troubles du spectres autistiques (TSA). Pour les domaines de l'intelligence, de la mémoire, de l'apprentissage, du langage, de la motricité, des émotions et des TDAH, les résultats sont apparus contradictoires. Les études observationnelles ayant utilisé des critères d'appariement très peu sélectifs, pour certaines le sexe et l'âge uniquement, montraient une fréquence plus importante de résultats neurodéveloppementaux moins favorables dans le groupe exposé. Enfin, sur les 13 études faisant explicitement la distinction entre exposition unique et exposition multiple à l'AG, 5 ont montré que l'exposition multiple était associée à des résultats plus défavorables dans un ou plusieurs domaines du développement neurocognitif (Figure 4).

Figure 4 : Représentation graphique des résultats pour chaque domaine d'évaluation cognitivo-comportemental *(issue de* [33]).



L'axe des X représente l'évaluation du risque de biais sur la base de l'échelle de Newcastle-Ottawa à 9 points pour l'évaluation du risque de biais dans les études observationnelles.

● *études qui ont montré une association entre l'exposition à l'AG et un déficit neurodéveloppemental (à la fois chez les enfants exposés de manière unique et multiple ou dans une étude qui n'a pas fait de distinction entre les deux).*

○ *études qui n'ont montré une association que chez les enfants multi-exposés, mais pas chez les enfants exposés de manière unique.*

● *études qui n'ont pas montré d'association (que ce soit chez les enfants exposés de manière isolée ou chez les enfants exposés de manière multiple, ou dans une étude qui n'a pas fait de distinction entre les deux).*

Retour au texte

Les conclusions de ces travaux sont ainsi loin d'être univoques et s'avèrent largement controversées. Cela est en partie dû à la grande hétérogénéité dans la conception des études, les types et le nombre d'exposition à l'AG, le choix des critères de l'évaluation neurodéveloppementale (quotient intellectuel (QI), résultats scolaires, troubles de l'apprentissage, troubles de comportement, et autres évaluations des fonctions exécutives ou socio-émotionnelles plus spécifiques), le délais entre l'exposition et l'évaluation des patients, l'absence de recueil des modalités anesthésiques (agents utilisés, monitorage des constantes vitales …) et la présence de nombreux facteurs de confusion dans les populations étudiées (âge/prématurité, chirurgie/procédure diagnostique, comorbidité et pathologie préexistante, facteurs socio-économiques…) [32].

Face à toutes les controverses liées à la nature des études de cohorte rétrospectives, plusieurs études cliniques de type prospectif et multicentrique, ont été menées ces dernières années. Parmi celles-ci, 3 présentent un haut niveau de preuve :

- la « Pediatric Anesthesia Neurodevelopment Assessment (PANDA) study » [34] avait pour objectif d'évaluer si l'exposition à une AG unique avant l'âge de 3 ans, chez des patients par ailleurs en bonne santé, était associée à une altération du développement neuro-cognitivo-comportemental plus tard dans l'enfance. Cette étude bidirectionnelle (rétro-prospective), appariée entre fratrie, a recruté 105 paires de frères et sœurs dont l'un des deux avait été exposé à une AG unique pour une cure de hernie inguinale (chirurgie courte et peu invasive) avant l'âge de 3 ans. Le critère de jugement principal était l'évaluation des fonctions cognitives globales par la mesure du niveau de QI et

les critères secondaires, l'évaluation de fonctions cognitivo-comportementales plus spécifiques (mémoire, fonctions exécutives, motrices, visuo-spatiales, langage, attention et comportement …). Ces évaluations étaient réalisées entre l'âge de 8 et 15 ans. Les résultats de l'étude PANDA ne font état d'aucune différence statistiquement significative en termes de QI. De même aucune différence n'était rapportée sur les tests de mémoire, langage, attention et fonctions exécutives entre les frères et sœurs ayant été exposés ou non à une seule anesthésie courte avant l'âge de 3 ans ;

- la « Mayo Anesthesia Safety in Kids (MASK) study » [35] avait pour hypothèse principale que l'exposition avant l'âge de 3 ans à des procédures multiples sous AG était associée à des conséquences négatives sur le développement neurologique. Les enfants exposés à une ou plusieurs AG avant l'âge de 3 ans ont été appariés par score de propension à des enfants non exposés. Près de 1000 patients ont été inclus dont 411 non exposés, 380 avec une exposition unique et 207 avec expositions multiples. Tous les patients ont fait l'objet d'une évaluation neuropsychologique entre 8 et 12 ans ou entre 15 et 20 ans. Cette étude de cohorte a révélé que l'exposition à une ou plusieurs anesthésies avant l'âge de 3 ans n'était pas associée à un déficit des capacités cognitives globales (QI). Une exposition unique n'était pas non plus associée à des déficits dans d'autres domaines neuropsychologiques spécifiques. Cependant, les patients ayant eu de multiples expositions présentaient de discrètes diminutions de la vitesse de traitement des données et de la coordination motrice fine, sans atteinte des autres indicateurs psychométriques évalués ;

- la « General Anesthesia vs. Spinal Anesthesia (GAS) Study » [36] est la seule étude prospective randomisée contrôlée publiée à ce jour. L'objectif de

cette étude de non-infériorité était d'évaluer si l'exposition à une AG unique et de courte durée (< 60 min) avant 60 semaines d'âge post-conceptionnel était associée à des modifications neurodéveloppementales cliniquement significatives à long terme. Plus de 700 nourrissons (âge moyen ~70 jours) devant bénéficier d'une cure de hernie inguinale ont été inclus dans 28 centres d'Amérique du Nord, d'Europe, d'Australie et de Nouvelle-Zélande. Les patients étaient randomisés soit dans le groupe « AG » soit dans le groupe « anesthésie loco-régionale » (rachianesthésie ou caudale). L'évaluation neurodéveloppementale a eu lieu à l'âge de 5 ans avec pour critère de jugement principal le QI (une différence de 5 points, 100 étant la norme de la population, étant considérée comme cliniquement et statistiquement significative). Le critère de jugement secondaire était ici encore une évaluation neuropsychologique des fonctions cognitives spécifiques telles que l'attention, la mémoire, les fonctions exécutives, le langage et la parole et les troubles du comportement. Les résultats de l'étude GAS sont concordants avec les données des 2 précédentes études de cohorte. L'exposition à une anesthésie générale courte (moins de 60 min) dans la petite enfance n'altérait pas les résultats neurodéveloppementaux à l'âge de 5 ans par rapport à une anesthésie loco-régionale éveillée.

Les résultats de ces trois études peuvent donc apparaitre rassurants, ne mettant en évidence aucune différences concernant leur critère de jugement principal, à savoir les fonctions cognitives globales, après une exposition unique et courte à l'anesthésie générale dans la petite enfance [34–36]. Du fait de critères de jugements primaires et secondaires superposables, une méta-analyse incluant ces trois études a été récemment publiée [37]. Sur les 1644

enfants inclus, les données étaient disponibles, en fonction du test d'évaluations considérés, pour environ 840 enfants exposés à L'AG et 800 enfants non exposés. L'absence de différence en termes d'intelligence globale après une anesthésie unique de courte durée (45 min, 84 min et 54 min pour les études MASK, PANDA et GAS respectivement) était confirmée par cette méta-analyse. Cependant l'analyse combinée des critères de jugements secondaires rapportait une faible association entre l'exposition à l'AG et le risque de survenue de troubles comportementaux touchant en particulier les fonctions exécutives et adaptatives.

L’ensemble des données cliniques que nous venons de présenter soulèvent plusieurs réflexions :

- premièrement, ces résultats ne nous permettent pas de conclure sur l’absence d’association après des expositions anesthésiques plus longues ou multiples, ou chez des enfants présentant des affections médicales plus complexes et/ou ayant besoin d’interventions chirurgicales majeures. En effet, les données animales pré-cliniques, que nous détaillerons plus loin, indiquent des effets neurotoxiques dépendant de la dose et de la durée d’exposition à l’anesthésie [26–30]. A noter que 10 à 25 % des enfants de moins de 3 ans devant bénéficier d’une intervention chirurgicale sont exposés à l'anesthésie pendant plus de 3 heures [2,38]. Pour tenter de répondre à la question de l’impact neurodéveloppemental de l’exposition prolongée ou multiple à l’anesthésie avant l’âge de 4 ans, Colletti et al. ont réalisé une revue systématique de la littérature et retenu 10 études publiées entre 2009 et 2021. L’analyse a porté sur une cohorte totale de 264 759 enfants non exposés et 11 027 enfants multi-exposés à l’AG avant l’âge de 4 ans. Les 10 articles inclus dans cette revue ont rapporté une différence statistiquement significative entre les enfants non exposés et ceux multi exposés sur les scores des tests dans certains domaines spécifiques du neurodéveloppement. Ici encore, on ne peut tirer de conclusion sans garder en tête l’ensemble des facteurs de confusion qui sont susceptibles de biaiser ces résultats. Par ailleurs, une limitation majeure de cet article est l'absence de faisabilité d’une méta-analyse du fait de l’hétérogénéité des critères d’évaluation ;

- deuxièmement, la méta-analyse des données collectées de manière prospective par les études PANDA, MASK et GAS a conclue à l’absence de différence sur le niveau de l'intelligence générale mais rapportait des scores

inférieurs dans les fonctions exécutives et adaptatives et une fréquence plus importante de troubles comportementaux chez les enfants exposés [37]. Bien que restrictive, avec seulement 3 études incluses, cette méta-analyse suggère que l'exposition à l'anesthésie pourrait être préférentiellement associée à des déficits dans certains domaines spécifiques du développement neuropsychologique et pas dans d'autres. Afin de tester cette hypothèse, Reighard et al. ont évalué via différentes méta-analyses, l'associations entre l'exposition à l'anesthésie générale et les résultats des tests neuropsychologiques classés selon 13 domaines spécifiques [39]. Trente et une étude ont été sélectionnées, dont les 3 études prospectives précédemment présentées. Des différences statistiquement significatives ont été observées dans certains domaines et sous-domaines du développement neurologique, mais pas dans tous. Afin d'apporter une interprétation plus informative que la seule valeur du « p », les auteurs ont utilisé la taille d'effet (effect size) mesurée sur l'amplitude de la déviation standard moyenne. Sur la base de cette interprétation, tous les résultats étaient associés à une faible taille d'effet, et ce quel que soit le nombre d'exposition. Le domaine de la cognition, mesuré principalement à l'aide du QI, s'est avéré avoir le lien le plus faible avec l'exposition à l'AG tandis que les différences les plus marquées concernaient les troubles du comportement, des fonctions exécutives, du raisonnement non verbal et des fonctions motrices. Enfin, la taille de l'effet chez les enfants multi exposés s'est révélée deux fois plus importante que celle des enfants avec exposition unique.

Ces derniers résultats sont soutenus par les plus récentes revues de la littérature qui semblent toutes suggérer une association entre l'exposition à l'anesthésie au cours de la petite enfance et certains troubles

comportementaux et socio-affectifs (troubles des fonctions exécutives, du domaine du langage, de la vitesse de traitement de l'information, de la coordination motrice, des domaines d'intériorisation et d'extériorisation, TDAH, TSA …), avec un risque accru pour les patients multi exposés [32,37,39–46].

Comme nous l’avons vu, la quasi-totalité des études s’étant intéressée aux effets à long terme de l’exposition à l’anesthésie dans la petite enfance sont de nature observationnelle et donc sujettes à de nombreux biais et facteurs de confusion non mesurés : en premier lieu le stress chirurgical mais aussi les problèmes médicaux sous-jacents, les perturbations physiologiques péri opératoires ou les traumatismes psychologiques dus à l'hospitalisation. Aussi, aucun lien de causalité directe n’a pu être établi entre une exposition précoce à l’AG et un risque accru de troubles neuro-cognitivo-comportementaux. Les preuves cliniques de ces effets potentiellement neurotoxiques restent donc à démontrer. Cependant, la mise en évidence de déficits dans certains domaines du développement cognitif et pas dans d'autres après exposition aux AA nécessite de poursuivre les investigations afin de déterminer si ces effets peuvent être attribués à l'exposition aux AA et le cas échéant les mécanismes qui en seraient à l'origine.

B. LES AGENTS MÉDICAMENTEUX DE L'ANESTHÉSIE GÉNÉRALE

1. UN PEU D'HISTOIRE …

Le terme « *anesthésie* » est dérivé du grec *αn - "sans" et aisthētikos "perception" ou "sensation".* Il est défini dans le dictionnaire *Larousse* comme une « perte locale ou générale de la sensibilité, en particulier de la sensibilité à la douleur (analgésie), produite par une maladie du système nerveux ou par un agent anesthésique ». Durant des siècles et jusqu'au milieu des années 1800, l'impossibilité de contrôler la douleur induite a été un des principaux obstacles à la chirurgie, limitant le champ d'action de cette dernière à ce que le patient pouvait tolérer.

a) NAISSANCE DE L'ANESTHÉSIE « CHIRURGICALE »

Si dès l'antiquité, un certain nombre de substances ont pu être utilisées pour limiter la perception de la douleur, tel que la racine de mandragore, le chanvre indien (cannabis), l'alcool, ou encore la sève de pavot (*Papaver Somniferum* ou opium), leurs effets restaient très limités. Ambroise Paré (1510-1590), qualifié de « père de la chirurgie moderne », utilisait par exemple un mélange d'alcool et d'opium pour tenter de soulager la douleur des opérés sur les champs de bataille. Cependant l'utilisation de la sève de pavot fut rapidement limitée par la faible marge thérapeutique entre la dose analgésique et la dose létale.

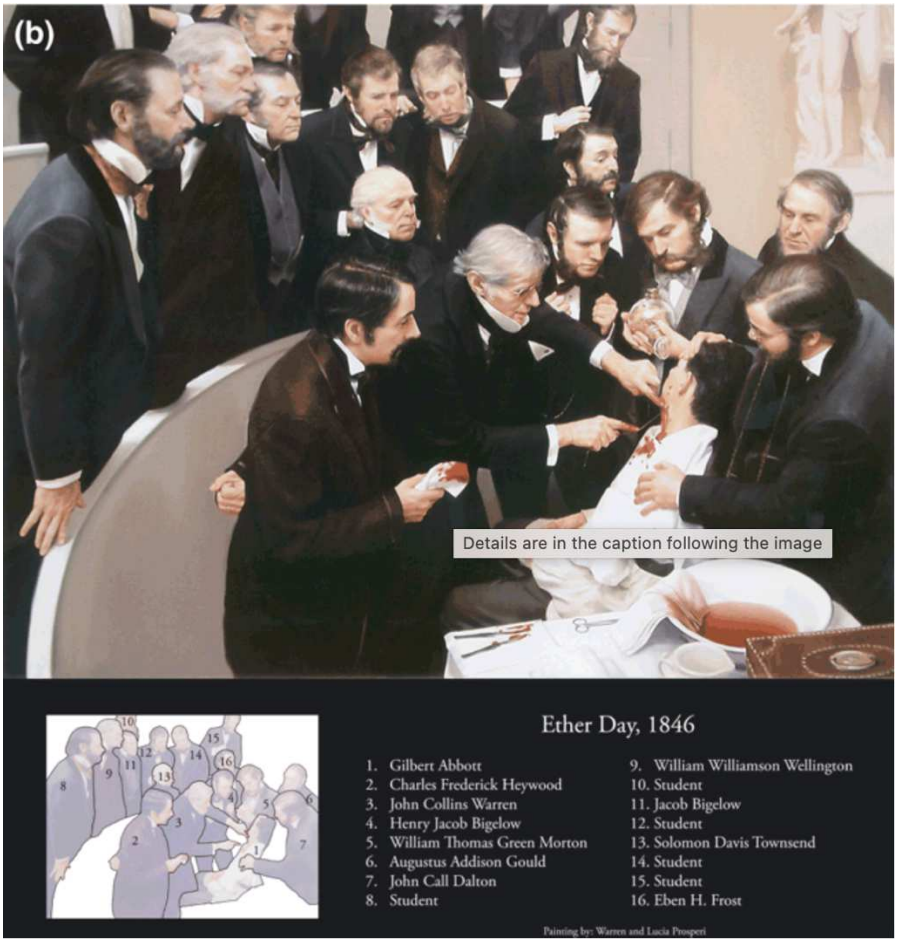
La découverte du protoxyde d'azote (N_2O) et de ses propriétés analgésiques et euphorisantes par Humphry Davy en 1799 marque les prémices de l'histoires de l'anesthésie. Malheureusement son utilisation à des

fins médicales ne sera initialement pas retenue. Le N_2O restera pendant près d'un siècle réservé uniquement à des fins récréatives ou pour des spectacles de cirque sous le nom de « gaz hilarant ».

C'est au milieu du XIXème siècle que naitra l'anesthésie « chirurgicale » à proprement parler avec l'utilisation de l'éther puis du chloroforme : le 16 octobre 1846, William Thomas Green Morton (1819-1868), fit au Massachusetts General Hospital de Boston, la première démonstration publique d'une perte de conscience par inhalation d'éther sulfurique chez un patient souffrant d'une volumineuse tumeur vasculaire du cou (Image 1). Après le succès de cette opération, l'anesthésie à l'éther fut alors considérée comme une avancée médicale majeure et son utilisation sera largement diffusée à travers le monde. L'éther présentait cependant un certain nombre de limites du fait de son inflammabilité, d'un délais d''induction prolongé, d'une incidence élevée de nausées et vomissements, et d'une odeur très désagréable et persistante. L'année suivante, le britannique James Young Simpson rapportait le potentiel intérêt médical du chloroforme qu'il utilisa comme anesthésique obstétrical pour la première fois le 19 janvier 1847. Ces observations seront suivies des premiers travaux scientifiques sur l'étude des propriétés physiques et pharmacologiques de ces gaz « anesthésiants » par le britannique John Snow (1813-1858), considéré comme le premier médecin spécialiste en Anesthésie. Son travail a établi la base scientifique de l'anesthésie administrée par voie inhalée en déterminant la relation entre la solubilité, la pression de vapeur et la puissance des gaz anesthésiants. Ce fut la première fois qu'une relation dose-réponse aux gaz anesthésiques était démontrée. Il a aussi mis au point le premier système d'administration de ces gaz permettant le contrôle des concentrations inhalées [47].

Image 1 : Journée de l'éther (1846) (issue de [48]).

Peinture moderne (2001) de la première démonstration publique réussie d'une intervention chirurgicale réalisée sous anesthésie à l'éther ; plusieurs anesthésistes et chirurgiens actuels et anciens du Massachusetts General Hospital ont servi de modèles aux artistes Lucia et Warren Prosperi.



Retour texte

Le chloroforme apparaissait plus puissant que l'éther mais avec une marge thérapeutique beaucoup plus étroite. Ainsi, très rapidement, les premiers cas de complications fatales furent rapportés [49]. Malgré cela, les anesthésies à l'éther et au chloroforme ont constitué à l'époque un énorme progrès et ces agents ont continué à être utilisés, y compris chez l'enfant, jusqu'au début du XXème siècle (Image 2).

Image 2 : Anesthésie à l'éther *(issue de* [50]).

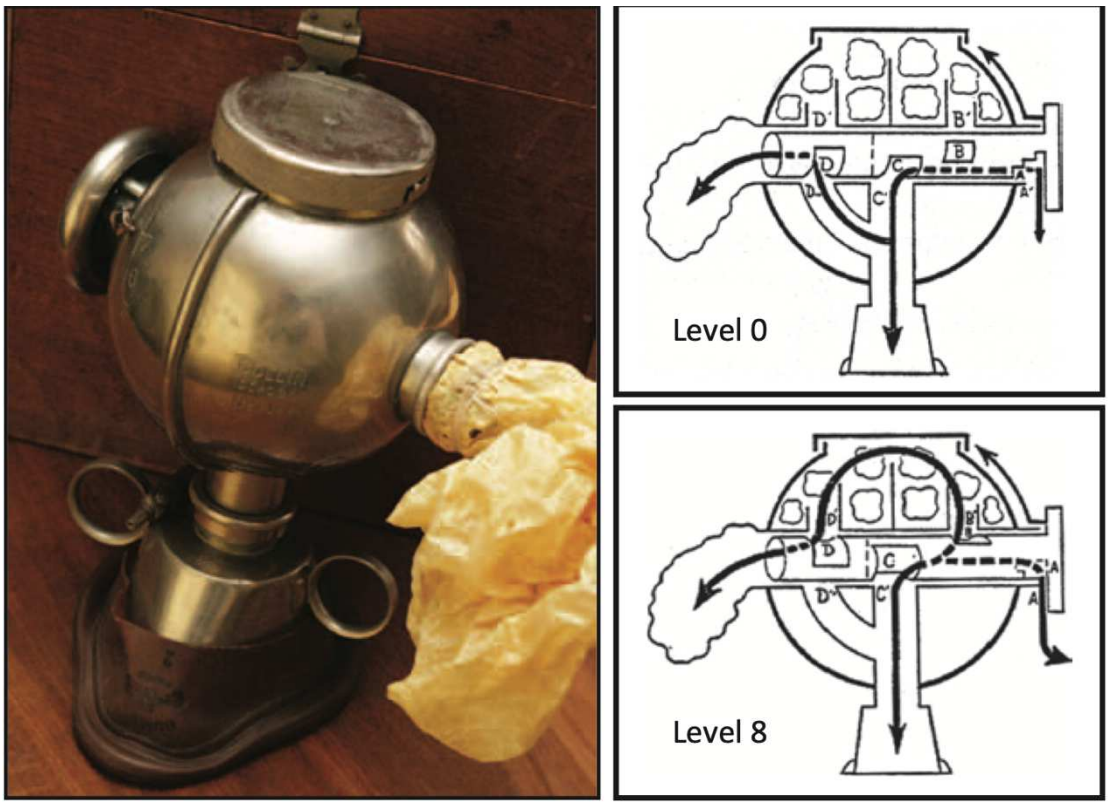
Rupert Hornabrook, premier anesthésiste à temps plein d'Australie produit une anesthésie en vaporisant du chlorure d'éthyle sur un tissu placé sur le visage d'un enfant de 9 ans le 8 mai 1915.



De nouveaux progrès sont devenus possibles avec l'essors de la technologie et des compétences nécessaires à l'administration de l'anesthésie. On doit l'une des innovations majeures à Louis Ombrédanne (1871-1956), chirurgien pédiatrique à l'hôpital Necker de Paris à la fin du XIXème siècle, qui a introduit un système permettant le contrôle de la fraction inspirée d'éther (Image 3). Ce système a été utilisé pendant plus de 50 ans, jusqu'à la moitié du XXème siècle.

Image 3 : Inhalateur d'Ombrédanne crée en 1908 *(issue de [51]).*

Cet appareil comporte un réservoir sphérique contenant des feutres imbibés d'éther, un cadran gradué de 0 à 8 permettant de régler la concentration d'éther délivrée au patient et une vessie de porc où se réalise le mélange de l'air atmosphérique et de l'éther.

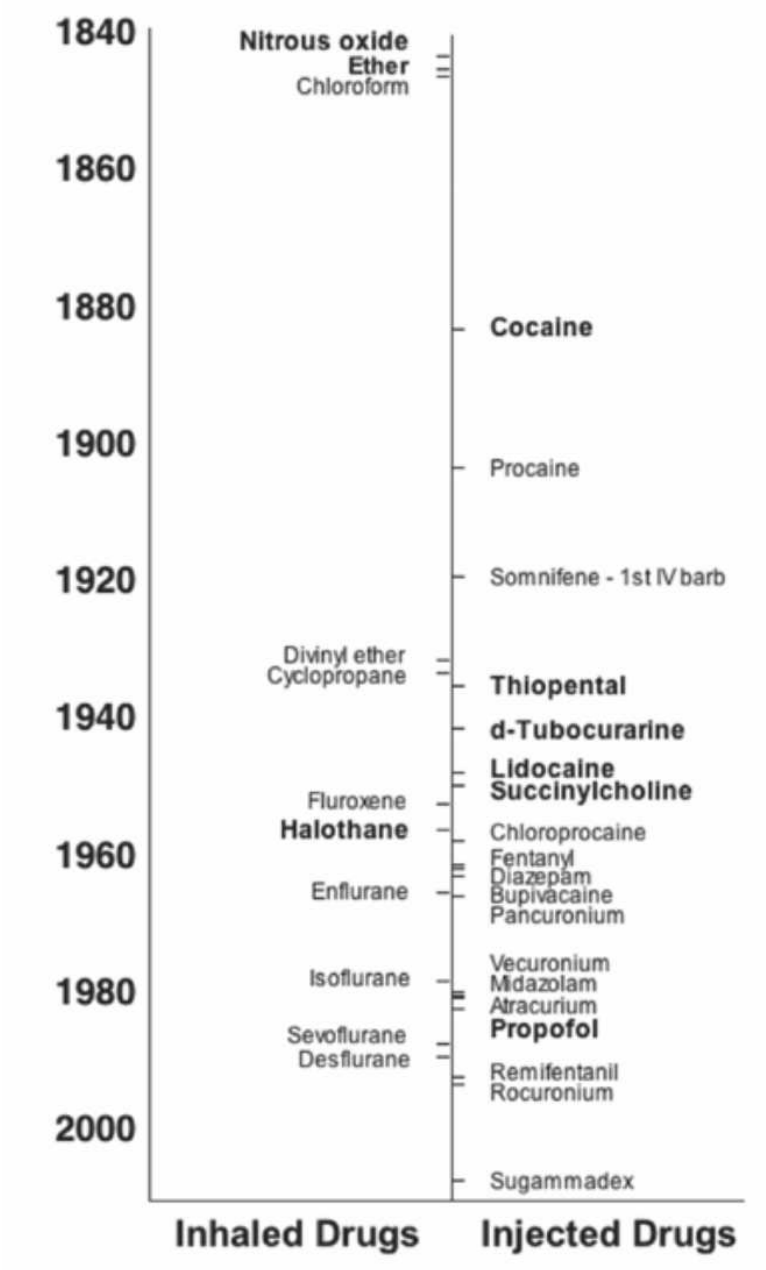


b) L'ANESTHÉSIE DITE « MODERNE »

Les progrès de la chimie du fluor (nécessaire à l'enrichissement des isotopes de l'uranium utilisés dans la fabrication d'une bombe atomique), notamment durant la Seconde Guerre Mondiale, sont à l'origine de la découverte des agents anesthésiques volatiles dits « modernes ». Le premier gaz anesthésique de type halogéné a été l'halothane, synthétisé en 1951 par Charles Suckling de l'*Imperial Chemical Industries* en Angleterre. Il a été utilisé pour la première fois en clinique dans les années 1960 mais est aujourd'hui quasiment abandonné du fait de sa toxicité cardiaque et hépatique [52].

Le milieu du XXème siècle fut aussi marqué par le développement des AA administrés par voie intraveineuse avec la synthèse des barbituriques (pentobarbital, hexobarbital, thiopental) ou encore des premiers dérivées opiacés (mépiridine). La kétamine, un dérivé synthétique de la phencyclidine, a été mise au point en 1962 et a d'abord été utilisée en médecine vétérinaire. Les effets cardiovasculaires limités et l'absence de dépression respiratoire associés à l'utilisation de kétamine à doses thérapeutiques en font un médicament de choix pour les sédations procédurales en médecine d'urgence. Elle fut utilisée pour la première fois en clinique sur des soldats américains pendant la guerre du Vietnam [52–54]. La Figure 5 précise la chronologie des principales découvertes des médicaments d'anesthésie.

Figure 5 : Chronologie des principales découvertes de médicaments d'anesthésie (issue de [52]).



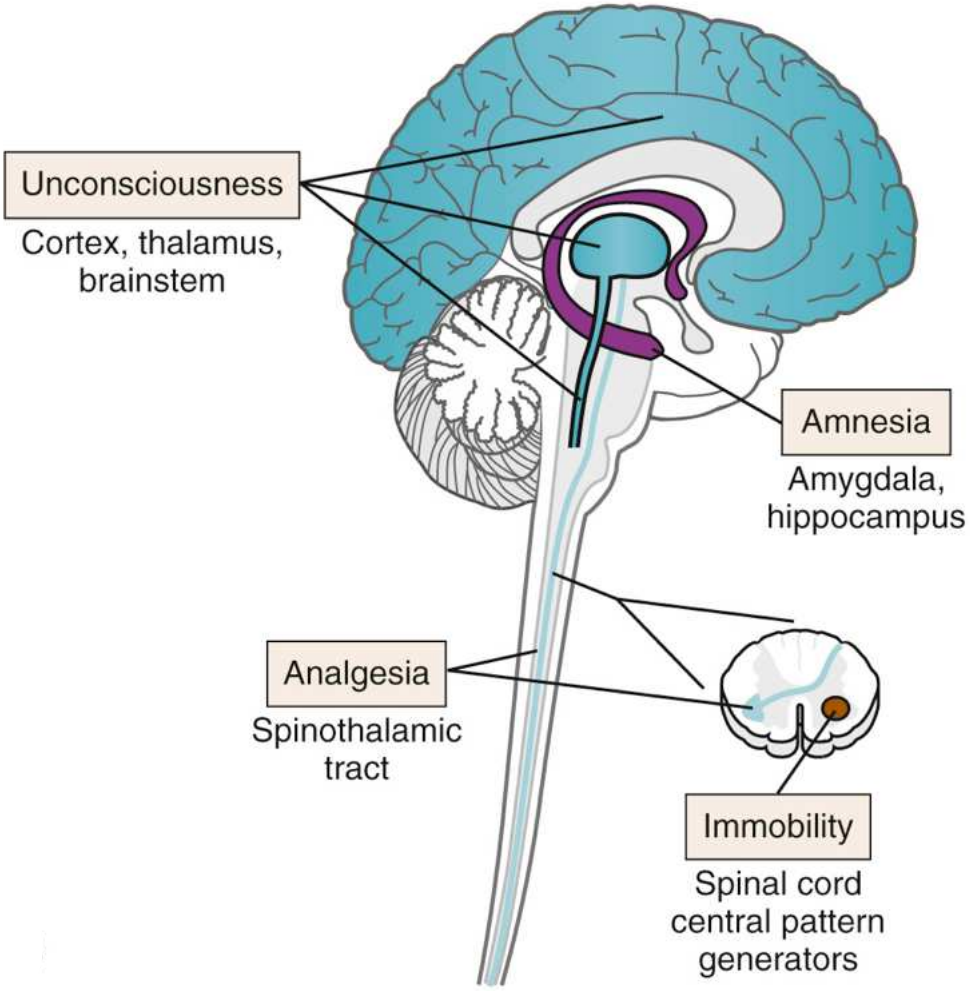
c) L'ANESTHÉSIE GÉNÉRALE AU XXIÈME SIÈCLE

Les deux principaux modes d'administration des AG sont aujourd'hui l'inhalation (voie respiratoire) suivie d'une absorption dans la circulation pulmonaire, et l'administration par voie intraveineuse. Les anesthésiques inhalés courants comprennent les agents halogénés volatils dérivés de l'éther, tels que l'isoflurane, le sévoflurane et le desflurane, ainsi que le protoxyde d'azote. Les anciennes générations d'anesthésiques volatils, l'halothane, l'enflurane et le méthoxyflurane, ne sont plus utilisées en clinique car associés à une morbi-mortalité conséquente. Les anesthésiques injectables les plus courants sont le propofol, l'étomidate, les benzodiazépines et la kétamine. Les barbituriques tels que le méthohexital et le thiopental sont moins utilisés en clinique en raison de leurs effets indésirables.

Les composantes classiquement admises de l'AG incluent 1/ l'hypnose (ou narcose) associée à la notion d'inconscience, – 2/ l'amnésie et – 3/ l'immobilité. A cela vient s'ajouter le contrôle des réponses du système nerveux autonome végétatif aux stimuli nociceptifs et au stress chirurgical. Certains auteurs proposent également que tout médicament, agissant au niveau central ou périphérique, utilisé pour la gestion de l'anesthésie dans le but premier de protéger le patient du traumatisme de la chirurgie, soit intégré dans les composantes de l'anesthésie. Ainsi, une action analgésique est souvent incluse dans les composantes souhaitées d'une AG (Figure 6) [55]. La notion d'anesthésie balancée s'impose alors. Ce concept repose sur l'association d'agents hypnotiques (anesthésiques), d'opioïdes pour l'analgésie et parfois de relaxants musculaires (curares) pour l'immobilité. L'association de ces différents médicaments a ainsi permis de diminuer considérablement les doses

d'hypnotiques administrées et donc leurs effets dépresseurs cardio-vasculaires, par rapport à celles qui seraient nécessaires si l'agent hypnotique était utilisé seul.

Figure 6 : les différentes composantes et sites d'action supposés des agents anesthésiques inhalés *(issue de [56]).*



Retour au texte

La pratique de l'anesthésie au XXIème siècle repose sur des médecins et infirmiers spécialisés en anesthésie, l'association de diverses classes d'agents médicamenteux ciblant les différentes composantes recherchées et l'utilisation standardisée d'outils de surveillance avancés. Associée au développement de médicaments plus sûrs tels que le propofol et le sévoflurane, la possibilité de réaliser des procédures chirurgicales hautement invasives et complexes y compris chez des populations vulnérables est considéré comme l'un des plus importants progrès de la médecine.

Paradoxalement, malgré toutes ces avancées, le(s) mécanisme(s) d'action par le(s)quel(s) les anesthésiques généraux induisent une perte de conscience et une amnésie reste(nt) encore mal connu(s). Parallèlement, il reste aujourd'hui impossible de prédire les effets à long terme de l'exposition aux AA sur le SNC.

Pour la suite de notre propos, nous nous concentrerons sur les effets centraux des AA et en particulier sur les agents halogénés, tel le sévoflurane, agent parmi les plus utilisé en anesthésie pédiatrique.

2. MÉCANISMES D'ACTION SUPPOSÉS DES AGENTS ANESTHÉSIQUES

Si le sommeil naturel est l'état de conscience modifié le plus familier, l'AG produit, elle aussi, un changement profond et réversible des fonctions cérébrales marqué par une transition entre l'état d'éveil et l'état d'inconscience. Les notions de conscience et d'inconscience sont cependant encore mal définies et surtout ne font l'objet d'aucun consensus ; décrire l'action des agents anesthésiques, notamment sur la conscience, lorsque l'on ne peut établir précisément ce que sont la conscience et l'inconscience apparait ainsi difficile.

Malgré près de 200 ans d'utilisation, et une recherche active portée par le développement considérable des neurosciences, les mécanismes par lesquels les anesthésiques induisent une perte de conscience réversible restent une question encore non résolue.

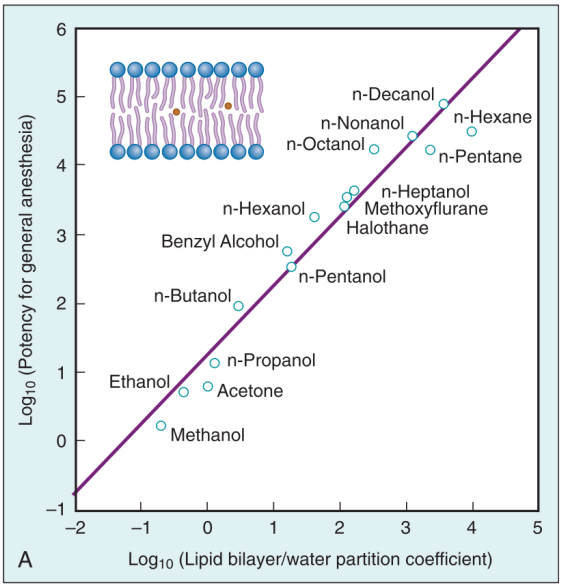
a) THÉORIE UNITAIRE NON SPÉCIFIQUE :

Les premières hypothèses pour expliquer les effets des AA ont été rapportées à la fin du XIXème siècle : Les travaux du botaniste Charles Ernest Overton à Zurich et du pharmacologue Hans Horst Meyer à Marburg ont mis en évidence une forte corrélation entre la puissance d'un anesthésique (capacité à abolir les réponses motrices à la stimulation nociceptive) et son coefficient de partage huile/eau (Loi Meyer Overton) (Figure 7A) suggérant que les anesthésiques volatils agissaient de manière non spécifique sur les composantes lipidiques hydrophobes des membranes cellulaires. Par la suite, diverses théories centrées sur les lipides vont émerger selon quatre hypothèses : les anesthésiques augmenteraient la fluidité lipidique,

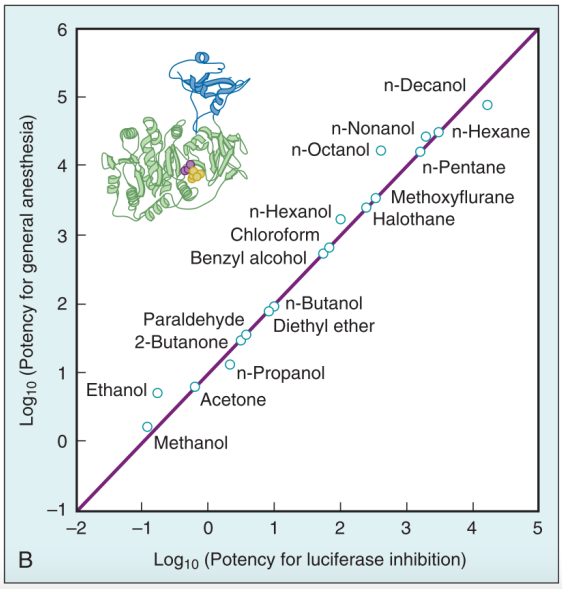
déclencheraient des transitions de phase lipidiques, modifieraient les dimensions de la bicouche lipidique (volume/épaisseur) ou modifieraient la perméabilité de cette dernière. Ces interférences avec la bicouche lipidique cellulaire seraient à l'origine de la perturbation de la fonction de nombreuses protéines ancrées dans la membrane [57,58]. Les hypothèses lipidiques de l'AG ont ainsi persisté jusqu'à la fin du XXème siècle, avant d'être remises en question dans les années 1980 par une seconde hypothèse centrée sur les protéines : les protéines pourraient être des cibles spécifiques et directes des gaz anesthésiques [59]. Nicholas P. Franks and William R. Lieb, pour étayer cette hypothèse, ont étudié l'action des AA sur l'enzyme luciférase, la protéine responsable de la luminescence des lucioles. L'action de cette enzyme sur son substrat la luciférine, en présence d'adénosine triphosphate, de magnésium et d'oxygène, induit l'émission de photons. En présence d'halothane (gaz halogéné anesthésique) à concentration clinique, l'activité de l'enzyme luciférase est apparu diminuée de près de 50%. La suppression de cette activité était par ailleurs reproduite avec une préparation de luciférase purifiée, totalement dépourvue de lipide. Une interaction protéique était donc la plus plausible. Afin de déterminer le mécanisme d'inhibition entrainé par les AA, les activités enzymatiques de la luciférase, pour une large gamme de concentrations de luciférine et d'anesthésiques, ont été mesurées. Ces travaux ont montré qu'une grande variété d'anesthésiques généraux pouvaient inhiber cette enzyme par liaison directe et qu'il existait une excellente corrélation entre les concentrations requises pour l'inhibition de l'enzyme luciférase et celles requises pour réaliser une anesthésie chez l'animal. L'inhibition est apparue purement compétitive, les molécules d'AA entrant en compétition avec les molécules de luciférine pour se lier à la protéine (Figure 7B) [60]. De ces

premières expérimentations, les auteurs concluront que 1/ les lipides n'étaient pas nécessaires à l'action des AA et 2/ les anesthésiques généraux agissaient en entrant en compétition avec les ligands endogènes pour se lier à des récepteurs spécifiques [60]. Ainsi des sites de liaison protéiques pourraient contribuer aux effets des anesthésiques généraux. C'est dès lors que la recherche des mécanismes moléculaires et des sites de liaison à l'origine de l'action des AA va s'intensifier [61,62].

Figure 7 : Les théories unitaires du mode d'action des agents anesthésiques *(Selon [61]).*



A. Corrélation Meyer-Overton (vers 1900) suggèrant que les lipides sont la cible principale des anesthésiques sur la base de la corrélation entre la puissance anesthésique et les coefficients de partage lipide-eau. La bicouche membranaire lipidique est représentée dans l'encadré.



B. Corrélation entre les puissances anesthésiques chez l'animal et leur capacité d'inhibition de l'enzyme soluble luciférase de la luciole. La structure cristalline de la luciférase est représentée dans l'encadré.

Retour au texte

Retour au texte

b) CIBLES MOLÉCULAIRES DES AGENTS ANESTHÉSIQUES INHALÉS

Les canaux ioniques voltage et ligand dépendants seraient les cibles les plus plausibles, incluant des effets à la fois pré- (en modulant la libération des transmetteurs) et post-synaptiques (en modulant les réponses post-synaptiques des neurones à des transmetteurs spécifiques) (Figure 8).

Les canaux ioniques récepteurs de neurotransmetteurs, en particulier les récepteurs de l'acide γ-aminobutyrique (GABA) de type A (R-$GABA_A$) et les récepteurs de type N-méthyl-D-aspartate (NMDA) glutamatergique, ont fait l'objet d'une attention particulière en raison de leur large distribution dans le SNC, de leur rôle physiologique essentiel dans les transmissions synaptiques inhibitrices et excitatrices et de leur sensibilité à des concentrations cliniquement pertinentes de divers AA [53,63–65].

Les R-$GABA_A$ sont les récepteurs inhibiteurs les plus abondants dans le cerveau. Ils appartiennent à la superfamille des canaux ioniques ligand-dépendants à boucle cystéine, dits « cys-loop », qui comprend également les récepteurs de la glycine, les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (R-nACh) et les récepteurs de la 5-hydroxytryptamine de type 3. Le R-$GABA_A$ est composé de cinq sous-unités glycoprotéiques (2 sous-unités α, 2 β et 1 γ), comportant chacune un domaine extra-membranaire contenant les sites de fixation du GABA et un domaine hydrophobe transmembranaire. Ces 5 sous-unités s'associent pour former un canal chlorure. Exprimés au niveau de la membrane post-synaptique, les R-$GABA_A$ génèrent des courants post-synaptiques inhibiteurs rapides (IPSC) et assurent la médiation de l'inhibition synaptique phasique. Outre la transmission synaptique phasique classique, une inhibition tonique par de faibles concentrations ambiantes de GABA cible

les récepteurs extra synaptiques régulant l'excitabilité des circuits neuronaux [66]. La liaison de ligands tels que le GABA, les benzodiazépines, l'alcool et les AA halogénés entraîne l'ouverture du canal récepteur, permettant un flux entrant d'ions chlore dans le neurone, à l'origine d'une hyperpolarisation et de l'inhibition de l'activité neuronale. Un site de liaison spécifique pour les agents volatils a été identifiés sur les R-$GABA_A$: ce dernier n'apparait pas extracellulaire (comme pour le ligand endogène GABA) mais situé au niveau du domaine transmembranaire des sous-unités α et β du R-$GABA_A$ [67–69]. L'action probablement principale des anesthésiques volatils semble être la potentialisation de l'inhibition de l'excitabilité neuronale post-synaptique médiée par les R-$GABA_A$, en augmentant la sensibilité des récepteurs au ligand endogène GABA, ainsi qu'en prolongeant le temps d'ouverture des canaux chlore [62,70].

Tous comme les récepteurs R-$GABA_A$, le R-nACh de type musculaire et neuronal fait partie de la superfamille des canaux ioniques ligand-dépendants pentamériques à boucle cystéine. Contrairement aux R-$GABA_A$, les R-nACh sont cations sélectifs avec une perméabilité élevée au calcium. L'activation des R-nACh est à l'origine du passage des cations et donc de la dépolarisation du potentiel de membrane. La plupart des anesthésiques généraux affectent l'activité des R-nACh, mais de manière négative. Les mécanismes potentiels d'inhibition comprennent le blocage des canaux, la stabilisation allostérique des canaux fermés et la désensibilisation [71]. Les R-nACh neuronaux dont le rôle est crucial dans la transmission synaptique, se sont avérés particulièrement sensibles aux anesthésiques volatils [72].

Le récepteur de type NMDA (R-NMDA) lie le glutamate extracellulaire, le principal neurotransmetteur excitateur du SNC des mammifères. Les R-

NMDA sont des hétérotétramères constitués de deux sous-unités GluN1 et de deux sous-unités GluN2 et/ou GluN3 [73]. L'activité de ce récepteur est modulée de manière allostérique par diverses substances dont la glycine qui est indispensable à l'activation du R-NMDA par le glutamate [74], et le magnésium, qui en se plaçant à l'intérieur du canal a un effet inhibiteur voltage dépendant [75]. L'ouverture du canal nécessite que le glutamate (ou un autre agoniste synthétique tel que le NMDA) se lie à la sous-unité GluN2, tandis que la glycine, co-agoniste endogène, se lie à la sous-unité GluN1. La dépolarisation de la cellule est nécessaire à la libération du magnésium bloquant le pore permettant d'initier le transport des ion sodium, calcium et potassium, à l'origine d'une augmentation de l'activité neuronale et de la potentialisation du potentiel d'action. De nombreux travaux suggèrent des interactions entre les anesthésiques volatils et les R-NMDA. Sur un modèle de récepteurs GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2B exprimés de façon recombinante dans des ovocytes de Xenopus, des concentrations cliniques d'isoflurane, de sévoflurane et de desflurane entrainaient une inhibition de 50% des courants ioniques médiés par les R-NMDA, de manière réversible, non compétitive, dépendante de la dose mais non du voltage [76]. Ces résultats ont cependant été nuancés : sur un modèle similaire d'ovocytes de Xenopus, le degré d'inhibition du sous-type GluN1/GluN2B du R-NMDA humain exprimé a été mesuré pour divers anesthésiques volatils. A concentration clinique équipotente, les courants ioniques des R-NMDA étaient en effet inhibés de manière réversible. Cependant le degré d'inhibition différait considérablement selon les AA allant de 14 ± 2 % pour le sévoflurane à 28 ± 3 % pour l'isoflurane [77]. Si les anesthésiques volatils semblent pouvoir inhiber les R-NMDA à des concentrations élevées, la plupart des données suggèrent que le mécanisme

de dépression de la transmission glutamatergique par les anesthésiques volatils serait principalement de type modulateur par une action pré-synaptique, et avec une contribution moindre au niveau des R-NMDA post-synaptiques [78,79].

Parmi les autres canaux ioniques sensibles aux anesthésiques inhalés, on peut citer :

- les canaux sodium et calcium voltage-dépendants qui font partie intégrante de toutes les fonctionnalités du SNC et en particulier la transmission synaptique ;

- la famille des canaux contrôlés par les nucléotides cycliques et activés par l'hyperpolarisation (HCN - Hyperpolarisation-activated Cyclic-Nucleotid modulated Cation Non-selective Channel), qui donnent lieu à des courants pacemaker et régulent l'excitabilité dendritique ;

- les canaux potassiques à 2 domaines pore (K2P) qui maintiennent le potentiel de membrane au repos dans de nombreuses cellules. En hyperpolarisant la membrane et/ou en augmentant la conductance de la celle-ci, ils réduisent les effets des courants excitateurs. Cinq membres de cette famille de canaux potassiques (TREK1, TREK2, TASK1, TASK3 et TRESK) semblent pouvoir être modulés par les anesthésiques généraux volatils [64,66].

Toutes ces cibles sensibles aux agents anesthésiques sont largement impliquées dans l'excitabilité et l'activité neuronales [53,63–65,79]. Les neurotransmetteurs, glutamate et GABA en particulier, sont des éléments clés de la balance excitation/inhibition (E/I) et jouent un rôle majeur dans différents processus associés au développement du cerveau (maturation et migration neuronales, synaptogénèse …).

Figure 8 : Principales cibles supposées des anesthésiques inhalés et leurs effets sur les canaux ioniques *(issue de* [63])

	Inhalational Anesthetics			
Target Sites	Sevoflurane	Desflurane	Isoflurane	Nitrous oxide
$GABA_A$	++(Nishikawa and Harrison 2003)	++(Nishikawa and Harrison 2003)	+(Garcia et al. 2010)	+(minimal) (Yamakura and Harris 2000)
NMDA	−(Eger et al. 2006)	−(Hollmann et al. 2001)	−(Dickinson et al. 2007)	−−(Yamakura and Harris 2000)
K_{2P}–*TREK-1*	+(Hamakawa et al. 1999)	+(Heurteaux et al. 2004)	+(Patel et al. 1999; Putzke et al. 2007)	+(Gruss et al. 2004)
K_{2P}–*TASK-1*	+(minimal) (Putzke et al. 2007)		+(minimal) (Patel et al. 1999; Putzke et al. 2007)	
Na^+ *channels*	−(Barber et al. 2014; Ouyang et al. 2009)	−(Barber et al. 2014; Ouyang et al. 2009)	−(Barber et al. 2014; Ouyang et al. 2009)	
Ca^{2+} *pumps*			−(Franks et al. 1995)	−(Franks et al. 1995)
Glycine receptors	+(Downie et al. 1996)	+(Brosnan and Thiesen 2012)	+(Downie et al. 1996; Yamakura and Harris 2000)	+(Yamakura and Harris 2000)
nAChR (α4β2)	−(Fodale and Santamaria 2004)		−(Piao et al. 2013)	−(Yamakura and Harris 2000)
HCN	−(Zhou et al. 2015a)		−(Chen et al. 2009b)	

+ : agonisme
- : antagonisme
++ : agonisme cible primaire ;
- - : antagonisme cible primaire
Minimal : effet minime et insignifiant qui fait l'objet de rapports périodiques
GABAA: γ-aminobutyric acid type A, NMDA: N-methyl-d-aspartate
K2P–TREK-1 : canal potassique TREK-, K2P–TASK-1 : canal potassique TASK-1
nAChR (α4β2) : récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine
HCN, protéines-canal HCN, (contrôlés par les nucléotides cycliques et activés par l'hyperpolarisation)

Retour au texte

Les anesthésiques généraux auraient ainsi des effets puissants sur la transmission synaptique avec de nombreuses cibles potentielles. La contribution relative des effets pré et post-synaptiques sur la transmission synaptique sont difficiles à déterminer, probablement parce que les effets sont spécifiques en fonction des récepteurs, neurotransmetteurs et des synapses. L'effet global des AA semble se traduire par une diminution de l'activité neuronale en augmentant la neurotransmission inhibitrice et/ou en diminuant la neurotransmission excitatrice et/ou en modulant la polarisation membranaire.

c) DE LA SYNAPSE À UN ÉTAT DE CONSCIENCE ALTÉRÉ … ?

Toutes les classes d'AA, bien qu'ayant des cibles moléculaires différentes et souvent multiples, conduisent à un même état réversible de conscience altérée. Établir un lien entre les effets des anesthésiques sur des canaux ioniques spécifiques et les effets de l'AG, notamment la transition progressive de l'état de veille à la perte de conscience et inversement, au niveau du « système », reste un défi de taille. Aucune région ou mécanisme cérébral unique n'a été identifié comme le corrélat neuronal de la conscience, ce qui suggère que la conscience pourrait être le fruit d'interactions complexes des fonctions cérébrales réparties dans l'espace et dans le temps. En effet, la plupart des processus cérébraux sont considérés comme des fonctions hautement complexes et dynamiques impliquant plusieurs réseaux cérébraux (et donc plusieurs zones du cerveau) qui travaillent ensemble pour exécuter des tâches individuelles. Pour induire un état réversible d'altération de la conscience, les anesthésiques généraux doivent agir sur le cortex cérébral, soit directement, soit indirectement par le biais d'actions sous-corticales, en agissant sur différentes structures cérébrales et sur la communication entre les différentes aires cérébrales. Ces processus ne semblent pas exclusifs mais au contraire interagir ensemble.

Le développement de techniques modernes de neurophysiologie et d'imagerie fonctionnelle (tomographie par émission de positons et imagerie par résonance magnétique fonctionnelle basée sur la cartographie des modifications métaboliques ou hémodynamiques comme reflet de l'activité neuronale) ont permis de grandes avancées dans l'identification des substrats anatomiques et fonctionnels des effets des anesthésiques sur le SNC. Les

observations d'une réduction du métabolisme cérébral par la plupart des AA hypnotiques et de leur effet déprimant sur l'électroencéphalogramme de surface ont été à la base de l'hypothèse d'une dépression diffuse et globale de l'activité cérébrale par les AA.

Le développement des technologies d'analyse des réseaux cérébraux et de leur connectivités structurelles, fonctionnelles et effectives apporte de nouvelles perspectives. En effet, loin de produire une suppression globale de l'activité cérébrale, les anesthésiques généraux agiraient sur différentes régions, corticales et sous corticales, influençant la fonction d'un certain nombre de réseaux spécifiques [80,81]. On suppose aujourd'hui que la perte de conscience induite par les anesthésiques est due à l'altération de la connexion fonctionnelle entre les différentes aires cérébrales, entrainant une altération dans la capacité à générer l'information et/ou à son analyse et intégration, à la base de l'altération de grandes fonctions cérébrales telles que la mémoire, la conscience et la cognition. L'implication des réseaux corticaux fronto-pariétal (impliqués dans les fonctions cognitives d'ordre supérieur) et de la boucle cortico-thalamo-corticale (impliqué dans la régulation de l'alternance des cycles veille-sommeil) a été largement décrite comme participant à la régulation de la perte de conscience observée lors d'une anesthésie au propofol et au sévoflurane [82,83].

Comme nous venons de le voir, malgré de très nombreuses découvertes au cours de ces 30 dernières années, les mécanismes qui sous-tendent les effets de l'anesthésie sont encore loin d’être parfaitement compris et intégrés au différents niveaux structurels et fonctionnels du SNC. Il existe un fossé entre la pharmacologie moléculaire des cibles anesthésiques potentielles et leur implication au niveau du réseau cérébral.

C. APOPTOSE, NEURODÉVELOPPEMENT ET ANESTHÉSIE

Nous avons vu dans la première partie de cette introduction que la pratique de l'anesthésie avait atteint un très haut niveau de sécurité. Nous avons également évoqué les inquiétudes soulevées par les résultats des études expérimentales et l'alerte de la FDA qui a suivi [24,25] : l'exposition précoce aux AA serait à l'origine de dommages aigus, notamment une apoptose généralisée, associés à des troubles du développement neurocognitifs à long terme. Ainsi, au-delà des effets souhaités et réversibles des anesthésiques généraux sur la conscience, l'altération de l'équilibre et de la dynamique de l'excitation et de l'inhibition neuronales au niveau des récepteurs membranaires, des synapses et des circuits cérébraux pourrait être à l'origine de l'altération des processus physiologiques du développement cérébral. En effet, la plupart des anesthésiques généraux modulent directement ou non les transmissions glutamatergiques excitatrices NMDA et/ou inhibitrices GABA [63]. Les R-NMDA et R-$GABA_A$ apparaissent co-localisés dans de nombreuses régions du cerveau et l'équilibre de leur interaction est un facteur clé pour la survie, la migration et la maturation des neurones ainsi que pour la formation des circuits neuronaux [84]. Une modulation de ces cibles pourrait avoir des effets potentiellement néfastes sur le développement normal du cerveau [85,86].

1. MORT CELLULAIRE PHYSIOLOGIQUE

Le développement cérébral résulte de la réalisation de programmes génétiques successifs aux cours des différentes étapes ontogéniques. Parmi les grandes étapes du développement cérébral on peut citer la neurogénèse (production de progéniteurs de neurones, puis de neurones matures) et la synaptogénèse. Au cours de ces étapes, la formation des circuits neuronaux dans le cerveau des mammifères en développement est caractérisée par une génération excessive de neurones puis l'élimination d'une partie substantielle de ces neurones qui ne sont pas correctement intégrés dans le système. Cette mort cellulaire dite « programmée » est ainsi un phénomène physiologique qui apparait essentiel au bon développement des organismes pluricellulaires et au maintien de la fonction normale des différents organes et tissus, y compris le cerveau.

Trois principaux types de mort cellulaire ont été historiquement décrits sur la base de leur manifestation morphologique : l'apoptose, l'autophagie et la nécrose [87]. Le terme « apoptose » a d'abord été introduit pour décrire un processus de mort cellulaire caractérisé par des altérations morphologiques spécifiques telles que la condensation de la chromatine, la fragmentation nucléaire et le maintien initial de la membrane plasmique suivie d'une fragmentation cellulaire en petites vésicules [88,89]. Il existe deux principaux types d'apoptose - intrinsèque et extrinsèque – selon que la voie d'activation à l'origine du processus soit induite par des perturbations du micro-environnement intra- ou extracellulaire. Ces deux voies sont précipitées par l'activation d'une famille de protéases à cystéine connues sous le nom de caspases [90].

Chez de nombreuses espèces, dont les mammifères, deux vagues de mort cellulaire programmée sont décrites au cours du développement cérébral. Ces deux vagues semblent avoir des objectifs différents : réguler la taille du pool de précurseurs neuronaux pour la première et assurer la mise en place et le bon fonctionnement des réseaux neuronaux pour la seconde [91] . La première vague de mort cellulaire programmée se produit au cours de la neurogénèse et consiste en l'élimination d'un grand nombre de neurones en division. Elle se déroule au milieu de l'embryogenèse chez le rongeur et au cours des deux premiers semestres de gestation chez l'homme. La deuxième vague de mort cellulaire programmée se produit lors de la synaptogénèse : les synapses neuronales se forment par une migration active des neurones vers leur destination finale. Tout en maturant, les neurones vont se connecter entre eux grâce à une ramification dendritique massive. Ainsi plusieurs milliards de contacts synaptiques vont permettre la formation de circuits et de réseaux neuronaux complexes essentiels à un développement comportemental et cognitif approprié. Si les synapses subissent un remodelage constant tout au long de la vie, au cours duquel de nouvelles synapses se forment et d'autres sont éliminées, l'essentiel des réseaux neuronaux fondamentaux se forment au cours de la synaptogenèse dite développementale qui se produit au cours des deux premières semaines de vie postnatale chez le rongeur. Elle s'étendrait entre le dernier trimestre de gestation et l'âge de 3 ans chez l'homme [92]. C'est au cours de cette synaptogénèse rapide que la seconde vague de mort cellulaire programmée va conduire à l'ajustement le plus important du nombre de cellules corticales ; les neurones et synapses redondants, défectueux, non ou mal intégrés dans les systèmes sont éliminés. L'ampleur de cette mort cellulaire programmée au cours du développement cérébral reste incertaine,

mais on suppose que près de 50% des neurones initialement générés meurent par apoptose [93–96].

2. BALANCE EXCITATION / INHIBITION

La mort cellulaire programmée apparait hautement régulée par les programmes génétiques, le soutien trophique et les facteurs pro et anti-apoptotiques [97]. Au niveau du SNC, cependant, il semble que l'activité électrique soit un facteur critique de la survie neuronale [91,98–102]. Ainsi, les neurones ne parvenant pas à s'intégrer dans un réseau neuronal actif sont éliminés, tandis que les neurones intégrés dans le réseau en développement entrent dans un cercle vertueux anti-apoptotique soutenue par les facteurs neurotrophiques. La mort cellulaire programmée pourrait ainsi être un mécanisme clé de l'ajustement du ratio final des neurones excitateurs et inhibiteurs dans le cortex cérébral, une étape cruciale pour le bon développement des réseaux corticaux et essentielle au fonctionnement normal du cerveau tout au long de la vie. Les principaux systèmes de neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs, le glutamate et le GABA respectivement, sont les acteurs de la détermination de la balance E/I qui sous-tend le niveau d'activité neuronale. Différentes études pharmacologiques rapportent que le blocage aigu des récepteurs du glutamate par différents antagonistes (kétamine, dizocilpine ou MK801) est capable de déclencher une neurodégénérescence apoptotique généralisée dans le cerveau des rongeurs en développement. Une mort massive des cellules neuronales a également été observée après exposition en période néonatale à des agents qui reproduisent ou potentialisent l'action du GABA sur les R-$GABA_A$, tels que les benzodiazépines ou les barbituriques à doses anti-convulsivantes [103–105]. Ces

observations suggèrent fortement que l'altération de la balance E/I (au niveau du neurone, entre neurones connectés localement ou au niveau du réseau entier) au cours du développement neuronal pourrait modifier l'équilibre entre la survie et l'apoptose des cellules au profit de la mort cellulaire et ainsi modifier la formation et la plasticité des circuits neuronaux. Des conséquences à long terme ne sont pas exclues et cette altération de la balance E/I a été impliquée en clinique dans plusieurs troubles du neurodéveloppement, tels que les TSA, la schizophrénie, l'épilepsie et les troubles généralisés des apprentissages [105–107].

Les AA sont connus pour moduler les transmissions GABAergiques et glutamatergiques [63] à l'origine d'un impact probable sur l'équilibre E/I. C'est ainsi que ces 3 dernières décennies, de nombreux travaux sur différents modèles animaux, allant des nématodes aux mammifères, font état d'une potentielle neurotoxicité de la plupart des AA couramment utilisés en pratique clinique.

3. NEUROTOXICITÉ ET AGENTS ANESTHÉSIQUES : DONNÉES EXPÉRIMENTALES

Les premières données pré-cliniques relatives à une potentielle neurotoxicité de l'AG sur le cerveau en développement ont été rapportées au début des années 2000. Ikonomidou et al. ont montré que le blocage des R-NMDA par exposition à la dizocilpine (MK-801) ou à de la kétamine, au cours de la première semaine de vie des rongeurs, était associé à une apoptose cérébrale généralisée [108]. Ces résultats suggéraient que l'activité excitatrice du glutamate au niveau des R-NMDA pourrait jouer un rôle central dans la survie des cellules cérébrales. Ces résultats ont ensuite été étendus aux agents potentialisateurs ou agonistes des R-$GABA_A$: les benzodiazépines et les barbituriques produisaient également une apoptose généralisée. Cependant, l'exposition à des agents modulateurs des récepteurs dopaminergiques, inhibiteurs des canaux ioniques voltage-dépendants ou antagonisant les récepteurs cholinergiques n'a pas produit d'apoptose généralisée dans le cerveau des rats exposés en période néonatale [109]. Cela suggérait que l'altération des transmissions glutamatergiques NMDA et GABAergiques étaient principalement responsables des effets pro-apoptotiques rapportés. Ainsi, a émergé la question des risques potentiels des AA aux effets antagonistes NMDA (la kétamine et N_2O) et/ou agonistes $GABA_A$ (midazolam, propofol, sévoflurane, isoflurane…) qui sont alors couramment utilisés au cours des procédures anesthésiques pédiatriques. En réponse, Jevtovic-Todorovic et al. ont exposé des rats de 7 jours de vie (P7) à des concentrations cliniques d'un « cocktail » anesthésique classiquement utilisé à cette époque (N_2O, isoflurane et midazolam) pendant 6 heures. L'analyse des marqueurs

d’apoptose sur les tranches de cerveaux des animaux exposés, rapportait une augmentation sévère et diffuse de l’apoptose dans plusieurs régions du cerveau dont le thalamus, l’hippocampe et le cortex. Les auteurs ont par ailleurs soumis les animaux exposés en période néonatale à différents tests comportementaux et rapporté des troubles de la mémoire et de l'apprentissage persistants à long terme [30]. Ces premières publications suggéraient ainsi non seulement, une mort cellulaire accrue à la suite de l’exposition précoce à différentes AA, mais aussi de potentiels effets à long terme sur le développement cognitivo-comportemental. Au cours des années qui ont suivi, de nombreuses équipes ont tenté de caractériser les effets neurotoxiques des agents anesthésiques, préciser leurs mécanismes et les potentielles conséquences à long terme. Ces études pré-cliniques ont, pour beaucoup, reproduit ces résultats sur différents modèles animaux, notamment les rongeurs et les primates : l’exposition précoce à l’AG était associée à une augmentation intense et diffuse de l’apoptose associée à des altérations neurodégénératives aigües et des troubles du développement neurocomportemental à long terme [28,30,110–113]. Tous les AA interférant avec les systèmes GABAergique et/ou glutamatergique ont été impliqués (revue de la littérature, se référer à [26,110,114–116]).

L’hétérogénéité des modèles animaux, des modalités anesthésiques et des techniques utilisées pour caractériser les effets neurotoxiques associés à l'exposition à des anesthésiques généraux nous conduisent à nous interroger sur les points de convergence, les controverses et leurs implications pour la pratique clinique :

- la neurotoxicité induite par l'exposition aux AA semble dépendre de l'âge d'exposition. L'équipe de Jevtovic-Todorovic, en se basant sur leurs premiers résultats, a étudié plus précisément la dynamique de la neurotoxicité induite par l'anesthésie chez le rat. Ils ont évalué la sévérité de l'apoptose induite par l'exposition aux mêmes modalités anesthésiques que dans leur étude princeps [30] (N_2O, isoflurane et midazolam) au cours des deux premières semaines de la vie postnatale (à 1, 3, 7, 10 et 14 jours postnatal). L'apoptose est apparue maximale au 7ième jour postnatal (P7) dans plusieurs régions corticales et sous-corticales. Cette vulnérabilité diminuait ensuite rapidement jusqu'à P14 où l'on ne retrouvait que peu de différences en comparaison aux animaux non exposés [27]. Ces résultats, par la suite confirmés par d'autre équipes, suggèrent une fenêtre étroite de susceptibilité à l'apoptose induite par une exposition à l'AG dans les deux premières semaines de vie des rongeurs [27,108,111,117–121]. Cette temporalité coïncide avec une période spécifique de « poussée de croissance » du cerveau - « the brain growth spurt » - ou pic de synaptogénèse rapide, dont on sait qu'elle est associée à la seconde vague de mort cellulaire programmée [122,123]. Elle atteint son maximum dans les quinze premiers jours de la vie postnatale du rongeur et s'étalerait entre le troisième trimestre de gestation et les premières années de vie chez l'homme [122,123]. Les périodes fœtales, néonatales, et la petite enfance pourraient ainsi être particulièrement à risque face à la potentielle neurotoxicité induite par l'exposition aux AA ;

- par ailleurs, la neurotoxicité induite par les AA semble dépendre de la dose cumulée d'anesthésique administré. Zheng et al. ont exposé des rats P7 à différents schémas d'anesthésie: sévoflurane 1% pendant 2 h ; ou 1% pendant 2 h ; ou 1% pendant 4 h ; ou 2% pendant 2 h ; ou 2% pendant 4 h.

Les cellules positives à la caspase-3 clivée (c-caspase-3), un marqueur d'apoptose, sur tranche de cerveaux, recherchées 6 h après la fin de l'exposition, était retrouvées dans plusieurs régions du cerveau, notamment le cortex et l'hippocampe avec une neurodégénérescence dépendante de la dose et de la durée d'exposition [28]. Des résultats similaires ont été rapporté chez de jeunes souris (P5-P7) exposées à des doses croissantes de propofol. La quantification des cellules positives au marquage c-caspase-3 au niveau de deux zones préalablement définies, le cortex et le striatum, suivait une courbe dose réponse linéaire [29]. Amrock et al. ont analysé l'effet de différents régimes d'anesthésie sur la densité synaptique au niveau de l'hippocampe de rats adultes exposés à différentes régimes d'anesthésie en période néonatale : de jeune rats (P7) ont été exposées soit à du sévoflurane 2,5% pendant 2h, soit pendant 6h consécutives, soit à 3 fois 2h pendant 3 jours (P7, P10 et P13). L'exposition néonatale à l'anesthésie était associée à une baisse importante de la densité synaptique de l'hippocampe à l'âge adulte. Par ailleurs, pour une durée totale équivalente de 6 heures, l'exposition répétée au sévoflurane entraînait une plus grande perte de synapses que l'exposition unique [124]. La neurotoxicité induite serait donc fonction non seulement de la dose et de la durée de l'anesthésie mais aussi du nombre total d'expositions [26–30,124] ;

- l'association d'agents ayant des effets agonistes GABA et antagonistes NMDA a été rapportée comme un facteur aggravant [112,125] ;

- la neurotoxicité induite par les anesthésiques semble toucher de nombreuses régions du cerveau. Parmi les plus citées, on retrouve le cortex, l'hippocampe, le thalamus ou encore le striatum [26,30,111,115,118–120,126]. Cette distribution anatomique n'apparait donc pas homogène dans l'ensemble du cerveau suggérant que certaines zones pourraient être particulièrement

sensibles. Cette variabilité anatomique des dommages structuraux rapportés reste cependant difficile à interpréter du fait de l'utilisation de différents modèles animaux (rongeurs, cobayes, porcelets, primates …), de différentes modalités d'administrations de l'anesthésie (durée et dose) et de différents agents utilisés isolement ou en association [121,127–131]. Chez le rongeur, modèle le plus communément utilisé, l'apoptose induite par les anesthésiques semble toucher relativement spécifiquement les cellules neuronales lors d'une exposition dans les premières semaines de vie. Cette période spécifique de synaptogénèse rapide est cependant variable d'une espèce à l'autre : chez le rat et la souris, elle apparait très condensée sur les 2-3 premières semaines postnatales, chez le cobaye, elle dure environ 10 semaines, et chez le porc, environ 20 semaines et se produit comme chez l'humain à la fois en pré et postnatal [92,121]. Par ailleurs, ce pic de synaptogenèse diffère non seulement entre les espèces, mais aussi entre les différentes régions cérébrales au sein d'une même espèce [118,119]. Hofacer et al. [118,119] ont émis l'hypothèse que les différences régionales de la neurotoxicité des anesthésiques pourraient refléter les différences régionales de la synaptogenèse et de l'apoptose développementale. Sur la base de cette hypothèse, des souris néonatales (P7), juvéniles (P21) et jeunes adultes (P49) ont été exposées à 1,5 % d'isoflurane. À la fin de l'anesthésie, la c-caspase-3 a été quantifiée dans plusieurs régions du cerveau qui sont connus pour avoir des pics de synaptogénèse précoces, tels que le cortex et le striatum, ainsi que dans le gyrus dentelé, région dont le pic apparait plus tardif. En période néonatale, une apoptose significative était retrouvée dans toutes les régions du cerveau examinées, à l'exception du gyrus dentelé. Chez les animaux juvéniles, en revanche, le schéma était inversé : le cortex et le mésencéphale étaient relativement épargnés, tandis que la mort cellulaire était

significativement augmentée au niveau du gyrus dentelé. Quant aux souris adultes, elles présentaient une augmentation faible mais persistante de l'apoptose uniquement dans le gyrus dentelé [119]. Cette vulnérabilité tardive par rapport à la fenêtre de susceptibilité précédemment observée pour le néocortex apparait concomitante à la neurogenèse tardive du gyrus dentelé. Ainsi, la période critique de vulnérabilité à l'anesthésie pourrait refléter un stade de maturation spécifique à chaque cellule ou zone fonctionnelle au cours de laquelle ils existent une sensibilité accrue à la mort cellulaire induite par l'anesthésie ;

- un certain nombre d'études ont suggéré que l'apoptose cérébrale induite par l'anesthésie pourrait être associée à des déficits cognitifs et comportementaux persistants : des rats exposés à P7 à un cocktail anesthésique classique (N_2O, isoflurane et midazolam) présentaient des lésions apoptotiques diffuses associées à des déficiences significatives dans le test du labyrinthe aquatique de Morris et du labyrinthe à bras radial (RAM) réalisé 32 jours (juvénile) et 151 jours (adulte) après l'exposition. Ces résultats suggéraient des déficiences de la mémoire spatiale et des apprentissages qui persistaient à l'âge adulte après une exposition précoce à une AG [30]. Si ces résultats ont été reproduits par d'autres équipes en utilisant un large éventail d'AA [112–114,132], une telle association n'a cependant pas été retrouvée dans d'autres études [133–136]. Yang et al. ont cherché à comparer la capacité du propofol et de l'isoflurane à induire une neurodégénérescence et des changements associés dans les fonctions cognitives de rongeurs en développement. L'exposition à 6h d'isoflurane (1,5%) ou une injection de 150 mg/kg de propofol (dose permettant une anesthésie profonde de 6h chez le rongeur) étaient associées à une apoptose accrue (cellule positive à la c-

caspase-3) dans le cortex et l'hippocampe des 2 groupes comparativement au groupe contrôle. Les lésions apoptotiques étaient significativement plus importantes dans le groupe isoflurane. Cependant, les effets structuraux neurodégénératifs n'étaient pas associés à des dysfonctionnements des apprentissages ou de la mémoire dans les test comportementaux (labyrinthe aquatique de Morris) réalisés 32 jours après l'exposition [136]. Une fois encore, les différentes modalités d'administration des AA, de tests cognitifs utilisés et le délai entre l'exposition et la réalisation des tests sont variables, ce qui rend l'interprétation des résultats difficile ;

- la mise en évidence de cette association entre lésions structurelles et troubles fonctionnels à la suite de l'exposition de cerveau en développement à l'anesthésie générale [30] a conduit beaucoup d'équipes à se concentrer sur les zones structurelles supposées associée aux déficits des fonctions cognitivo-comportementales mis en évidence. Afin de quantifier les différences résultant de l'exposition à l'anesthésie en période néonatale à divers stades du développement, les études classiques ont associé des analyses histologiques et immunohistochimiques à des test comportementaux. Les déficits fonctionnels rapportés étaient principalement liés à l'apprentissage et à la mémoire [30,137] mais aussi au comportement social [138,139] : ce sont donc les systèmes de transmission des données sensorielles et les réseaux liés à l'apprentissage et aux émotions (thalamus, hippocampe, cortex pré-frontal et système limbique entre autres), qui ont été le plus souvent ciblés [115]. D'autre structures sont cependant susceptibles d'être touchées par la neurotoxicité des anesthésiques [140]. Ainsi, les données actuelles semblent s'accorder sur le fait que l'exposition aux AA peuvent induire une apoptose diffuse dans le cerveau

en développement, cependant aucun lien de causalité entre la cytotoxicité et les déficiences cognitives et comportementales à long terme n'a pu être établi ;

- les schémas de lésions cellulaires peuvent varier selon le type d'anesthésie, la durée/dose d'exposition, le moment de l'exposition et la ou les régions cérébrales d'intérêt qui ont été choisies pour l'analyse. Les modalités techniques de mise en évidence des lésions structurelles sont donc également à prendre en considération. En effet, la plupart des études reposent sur une méthodologie impliquant l'exposition d'animaux immatures à l'anesthésie, suivie d'une analyse histologique et immunohistochimique du cerveau dont le modèle le plus commun a été l'imagerie microscopique en 2D sur tranche de cerveau. La section et la fixation des tissus est cependant susceptible d'altérer l'intégrité des structures et d'induire des déformations. Le plus souvent, l'analyse implique par ailleurs un nombre limité de coupes du cerveau dont l'épaisseur est variable en fonction des études ce qui peut impacter les résultats de l'immunomarquage. Par ailleurs, le choix aléatoire des coupes à analyser ou encore le choix préalable de la région cérébrale d'intérêt, ne fournit inévitablement que des informations partielles et sujettes à un biais de sélection.

Ainsi, l'application de nouvelles techniques permettant une approche exhaustive et sans biais anatomiques du cerveau en développement permettrait : 1/ de préciser et cartographier les régions cérébrales les plus vulnérables à la neurotoxicité des anesthésiques généraux 2/ cela en fonction de l'âge d'exposition et des agents utilisés 3/ ainsi que la recherche, guidée par la cartographie, des mécanismes cellulaires impliqués 4/ et la translation vers une analyse fonctionnelle ciblée selon la topographie des lésions observées.

II OBJECTIFS DE LA THÈSE

Le développement du cerveau est un processus continu et hautement régulé, marqué par des fenêtres pré et postnatales de grande vulnérabilité. Au cours de ces périodes critiques, l'élimination des neurones en excès ou non intégrés dans le réseau (apoptose développementale) est essentielle pour la formation de circuits fonctionnels. La survie et la migration des neurones, tout comme la synaptogenèse et à la plasticité cérébrale apparaissent hautement dépendantes d'un juste équilibre entre excitation et inhibition de l'activité cérébrale. Cet équilibre repose en grande partie sur les systèmes glutamatergique et GABAergique qui jouent un rôle clé dans la régulation de la balance E/I. La majorité des agents anesthésiques utilisés à des fins diagnostiques et thérapeutiques, connus pour leurs actions modulatrices sur ces transmissions glutamatergiques et/ou GABAergiques, sont ainsi susceptibles de perturber cette balance E/I, avec de possibles effets à long terme sur le développement des circuits cérébraux [40,41,141].

Comme nous l'avons vu, la plupart des agents anesthésiques utilisés en clinique peuvent, dans certaines conditions expérimentales, être responsables d'une apoptose cérébrale accrue. Cette mort cellulaire induite par l'exposition aux AA de cerveau en développement a été mise cause dans la survenue de troubles des fonctions neurocognitives persistantes chez l'animal adulte. Cependant, aucune preuve d'un tel lien de causalité n'a pu être établie à ce jour. La caractérisation exhaustive des lésions observées et de leurs dynamiques à la fois spatiale et temporelle, représente une étape essentielle à la compréhension des effets à court terme des anesthésiques sur le cerveau.

Dans ce projet de thèse, nous avons établi une cartographie tridimensionnelle exhaustive de l'apoptose induite par l'exposition au sévoflurane sur le cerveau entier de souris, au cours de son développement. Pour ce faire, nous avons appliqué une technique émergente de clarification des tissus, couplée à l'imagerie en trois dimensions (3D) (i-DISCO - three-dimensional imaging of solvent-cleared organs). Cette première étape nous a permis d'identifier les zones les plus affectées par l'exposition au sévoflurane. Guidés par cette cartographie, nous avons ensuite précisé la distribution anatomique des lésions et effectué une caractérisation immuno-cytochimique des cellules apoptotiques.

III MÉTHODOLOGIE

L'utilisation généralisée des microtomes, permettant de couper de fines tranches de tissus, a permis de révéler les constituants cellulaires de sections bidimensionnelles de tissus biologiques. Elle reste l'une des techniques les plus utilisées pour l'analyse histologique du cerveau. Cependant, les échantillons biologiques sont intrinsèquement tridimensionnels et la diffusion limitée de la lumière en profondeur rend l'imagerie de gros volumes problématique. Pour obtenir des informations en 3D, une des possibilités est de passer par une étape de reconstruction à partir d'une série de sections minces. Bien que cela puisse donner des résultats très utiles, cette approche nécessite beaucoup de temps et est sujette à des erreurs liées non seulement à la perte importante d'information lors du découpage de l'échantillon mais également à la distorsion des sections individuelles qui peuvent être déchirées, pliées, comprimées ou étirées. Avec des sections imparfaites, la reconstruction volumétrique finale peut s'avérer peu satisfaisante. L'autre possibilité est d'imager le volume sans le sectionner, ce qui évite les problèmes de distorsion et d'alignement. Le même échantillon peut par ailleurs être imagé plusieurs fois [142]. Le développement récent des techniques de clarification (transparisation) de tissus couplés à l'imagerie 3D, offre de nouvelles perspectives dans l'imagerie volumique à haute résolution de gros échantillons biologiques tels que des organes entiers. Appliquée chez la souris, cette technique permet l'analyse 3D du cerveau entier, sans nécessiter de coupes préalables. C'est l'approche que nous avons choisie afin de garantir une analyse exhaustive de l'ensemble du cerveau, dépourvue de biais anatomiques liés à la section des coupes et sans choix *a priori* des zones ciblées pour l'analyse.

A. MODÈLE ANIMAL MURIN

Toutes les procédures animales ont été menées conformément à la directive du Conseil des Communautés Européennes et supervisées par l'unité locale de protection des animaux de l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Montpellier (IGF- A34-172-41). Les expérimentations ont été conduites sur des souris de laboratoire de souche C57Bl/6J (Janvier Labs) naïves sur le plan expérimental. Les animaux utilisés en période néonatale ont été obtenus à partir de souris gestantes C57Bl/6J. Les portées étaient stabulées avec la mère jusqu'au début de l'expérimentation au 7ième jour de vie (P7 - P0 étant défini comme le jour de la naissance). Tous les animaux étaient stabulés dans une pièce avec contrôle des conditions de température (22± 2°C) et d'humidité (60%), et une alternance de cycles jour/nuit de 12 heures (lumières allumées de 7h30 à 19h30). Les animaux avaient libre accès à la nourriture et à l'eau. Le poids et l'apparence générale de toutes les souris ont été soigneusement contrôlés tout au long de l'expérience. Tout a été fait pour minimiser le nombre d'animaux utilisés et leurs souffrances.

B. PROTOCOLE EXPÉRIMENTALE : ANESTHÉSIE

Les souris appariées selon l'âge et la portée ont été réparties au hasard entre le groupe « sévoflurane » et le groupe « contrôle » (absence d'exposition à l'anesthésie). L'expérimentation était réalisée dans une chambre en plexiglas préchauffée et maintenue sur une plaque chauffante à 37°C. Dans le groupe sévoflurane, les animaux ont été exposés à P7 (période néonatale), P21 (période juvénile) ou P49 (période adulte) à 3% de sévoflurane à l'aide d'un vaporisateur spécifique à l'agent dans 100% d'oxygène comme vecteur

gazeux. L'exposition au sévoflurane comprenait 3 périodes consécutives de 2 heures, chacune séparée par une période d'éveil caractérisée par la récupération du réflexe de redressement. L'appréciation de la présence ou de l'absence du reflex de redressement est une évaluation comportementale non douloureuse permettant de définir, chez le rongeur, le niveau d'éveil ou d'hypnose. La perte du réflexe de redressement a été décrite comme un bon corrélat de la perte de conscience chez l'homme. Parallèlement la récupération du reflex de redressement, définie par la capacité d'un rongeur sur le dos à se retourner et à se remettre sur ses pattes, caractérise l'éveil et le retour d'une conscience perceptive de l'environnement [143,144].

Dans le groupe contrôle, les animaux ont été exposés, dans des conditions identiques, à 100% d'oxygène pendant 6h à P7, P21 ou P49. Le débit de gaz frais était de 1 L.min-1. Le protocole anesthésique ici appliqué est basé sur des travaux réalisés chez des rongeurs exposés en période néonatale à 3% de sévoflurane durant 6 heures : aucune altération du pH, des pressions artérielles en oxygène et en dioxyde de carbone, de la saturation artérielle en oxygène ou du débit sanguin cérébral dans des conditions anesthésiques similaires n'ont été rapportées [145,146].

Immédiatement après l'expérimentation, les souris ont été euthanasiées par décapitation et les cerveaux soigneusement prélevés et fixés pendant une nuit à 4°C dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4% dans un tampon de phosphate de sodium (PBS).

C. MÉTHODE I-DISCO+ SUR CERVEAUX ENTIERS DE SOURIS

La méthode i-DISCO+ (immunolabeling-enabled three-dimensional imaging of solvent-cleared organs) est une technique de clarification (transparisation) des tissus qui, couplée à l'immunomarquage des tissus, va permettre de réaliser une imagerie en 3D sans endommager les tissus. Autrement dit, cette technique offre l'avantage de pouvoir visualiser un environnement complexe, ici le cerveau entier de souris, dans son intégralité sans recourir à des coupes sériées et en s'affranchissant des limites de la microscopie optique classique. En effet, cette dernière permet d'imager sans difficulté des marqueurs présents sur des coupes fines de quelques dizaines de micromètres d'épaisseur ; mais au-delà d'une certaine épaisseur, la pénétration de la lumière dans l'échantillon biologique devient limitée. Un rayon lumineux envoyé sur un échantillon biologique complexe, tel que le cerveau, est rapidement diffusé et ne pénètre pas. L'échantillon est opaque et son analyse en profondeur est très difficile. Ainsi, la transparisation des échantillons biologiques est une étape essentielle qui vise à uniformiser les différents indices de réfraction de l'ensemble de l'échantillon afin de réduire les interfaces optiques. La transparisation des tissus n'est pas seulement avantageuse pour l'imagerie, mais apporte également un certain nombre de bénéfices pour l'immuno-marquage. En effet, puisque les anticorps servant au marquage doivent pénétrer le tissu par diffusion, la transparisation enlève la majorité des structures pouvant affecter la propagation des anticorps, rendant ainsi le marquage plus efficace et plus spécifique.

Nous avons appliqué dans ce travail, la méthodologie i-DISCO+ sur des cerveaux entiers de souris selon le protocole original publié par Renier et al. [147,148]. Cette technique de clarification utilise des solvants organiques qui vont permettre d'homogénéiser les indices de réfraction du cerveau après avoir éliminé les composés lipidiques, essentiellement les constituants des membranes cellulaires.

1. PRÉ-TRAITEMENT DES TISSUS

Cette première étape de pré-traitement des tissus a pour objectif une forte extraction de l'eau et des lipides des tissus pour favoriser la pénétration en profondeur des anticorps et comprend 3 phases : une déshydratation, une première délipidation et un blanchiment. Les échantillons (cerveaux entiers) fixés sont incubés dans une série de solutions méthanol / eau avec des concentrations progressivement croissantes de méthanol jusqu'à déshydratation complète. Après une nuit d'incubation dans un solvant détergent de dichlorométhane 66% / méthanol 33%, les échantillons sont incubés dans une solution de méthanol / peroxyde d'hydrogène 5% et conservés à 4°C pendant une nuit afin de favoriser la dépigmentation et diminuer l'auto-fluorescence des tissus. Enfin, les tissus sont réhydratés dans une série de solution méthanol / eau avec des concentrations progressivement décroissantes de méthanol. Avant l'immunomarquage, les échantillons sont incubés dans une solution de perméabilisation (Triton X-100 / 20% diméthylsulfoxyde (DMSO) / 0,3 M glycine) à 37°C pendant une nuit afin d'augmenter la porosité et favoriser la pénétration des solvants et des anticorps. Enfin les cerveaux sont placés dans une solution tampon de blocage

(PBS / 0,2% Triton X-100 / 10% DMSO/ 6% Donkey Serum) pendant 2 jours à 37°C pour empêcher la liaison non spécifique des anticorps primaires au tissu.

2. IMMUNOMARQUAGE

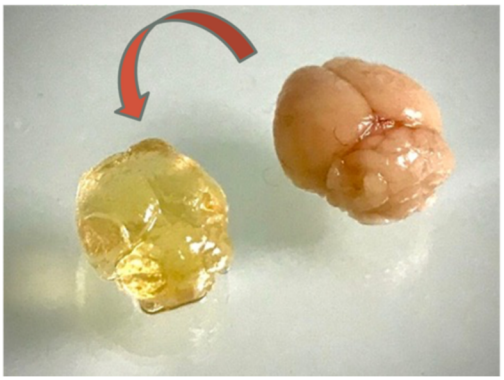
Afin de détecter la mort cellulaire induite par l'exposition au sévoflurane, nous avons utilisé comme marqueur d'apoptose, l'anticorps anti-caspase-3 clivée. Les échantillons prétraités ont été incubés avec l'anticorps primaire de lapin anti-caspase-3 (1:500, Cell Signaling 9662) dans une solution de PBS Tween-20 avec héparine (PTwH / 5% DMSO / 3% Donkey Serum) à 37°C pendant 10 jours. Après une nuit de rinçage, une incubation de 10 jours supplémentaires a été réalisée avec un anticorps secondaire anti-lapin alexa 647 (1:500 - Thermo Fisher A-315) dans une solution PTwH / 3% Donkey Serum à 37°C.

3. TRANSPARISATION

Pour finaliser la transparisation des cerveaux (image 4), une nouvelle étape de déshydratation et de délipidation est réalisée dans une série de solutions à concentrations croissantes de méthanol, avant incubation dans une solution de 66% de dichlorométhane / 33% de méthanol pendant 3 heures sous agitation. Les échantillons sont enfin lavés deux fois dans du dichlorométhane à 100 % et transférés dans du di benzyle éther (DBE) afin d'homogénéiser l'indice de réfraction de l'échantillon avec l'indice de réfraction de la solution de DBE utilisée pour l'imagerie.

Image 4 : Méthode i-DISCO+ (immunolabeling-enabled three-dimensional imaging of solvent-cleared organs):

Cerveaux entiers de souris avant et après transparisation



3 étapes étalées sur 28 jours de manipulation

1/Déshydratation méthanol, Blanchiment

2/Immuno-marquage

3/Transparisation

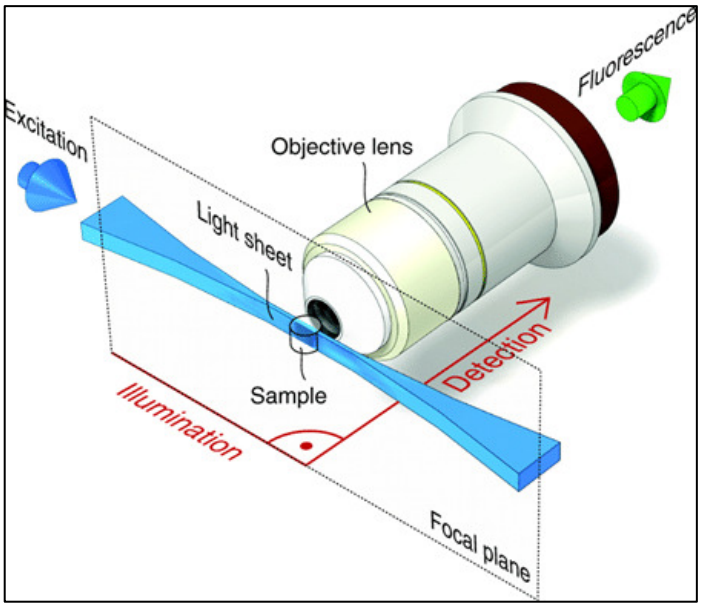
Retour au texte

4. IMAGERIE 3D DES CERVEAUX ENTIERS DE SOURIS TRANSPARISÉS

L'imagerie des cerveaux entiers de souris transparisés a été réalisée par microscopie de fluorescence à feuille de lumière (Light-Sheet Fluorescence Microcopy). La microscopie à feuille de lumière est basée sur un principe simple : la lumière qui éclaire l'objet biologique a la forme d'une feuille de quelques micromètres d'épaisseur. Dans un microscope confocal à fluorescence, l'acquisition d'une section optique est obtenue en balayant l'échantillon avec le faisceau d'excitation, et en collectant le signal de fluorescence émis en chaque point. Dans un microscope à feuille de lumière, le faisceau d'excitation est un plan orthogonal à la collection de la fluorescence. Ainsi, l'excitation est réalisée dans un plan entier de l'échantillon et la fluorescence collectée sur une caméra (image 5). Cela permet de réduire

considérablement la durée totale d'acquisition tout en conservant un sectionnement optique. Comme sur une trancheuse virtuelle, le déplacement de l'objet dans cette feuille de lumière permettra de réaliser des coupes optiques à toutes les profondeurs de l'échantillon. En fusionnant les images, on obtient une reconstruction tridimensionnelle de l'ensemble de l'échantillon.

Image 5 : Principe de la microscopie à feuille de lumière



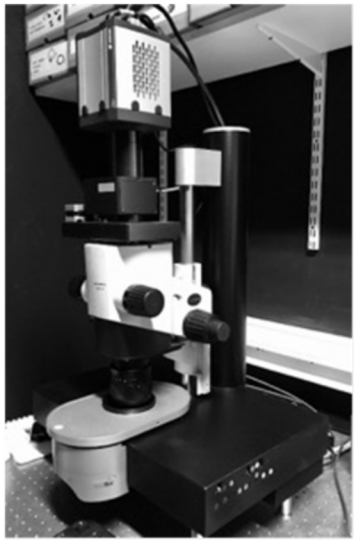
Retour au texte

Les échantillons (cerveaux entiers) ont été imagés dans une orientation horizontale avec un ultramicroscope (Miltenyi Biotec) équipé d'une caméra sCMOS et d'un objectif x2/0,5 (MV PL-APO - Olympus) avec une distance de travail de 5,7 mm (Image 6). Les cerveaux entiers ont été immergés dans une chambre remplie de DBE. Le logiciel de contrôle ImSpector Pro a été utilisé. Les images ont été acquises à un grossissement de x0,63 avec un temps d'exposition de 100 ms, dans des piles axiales de 3,5 µm d'intervalle inter-

image (0,035 NA - feuille de lumière de 7µm d'épaisseur). Les données ont été acquises dans deux canaux de fluorescence, un dédié à l'auto-fluorescence et l'autre au signal émanent des anticorps. L'auto-fluorescence a été acquise à la longueur d'onde d'excitation de 488 nm dans un filtre de bande passante 525/50 nm. Le canal spécifique à l'anticorps a été acquis à une longueur d'onde d'excitation de 639 nm dans une bande passante 680/30 nm.

Image 6 : Poste d'imagerie

Cerveaux entiers de souris P7 transparisés et immuno-marqués prêts à être imagés en microscopie à feuille de lumière





Retour au texte

a) TRAITEMENT DES IMAGES TRIDIMENSIONNELLES

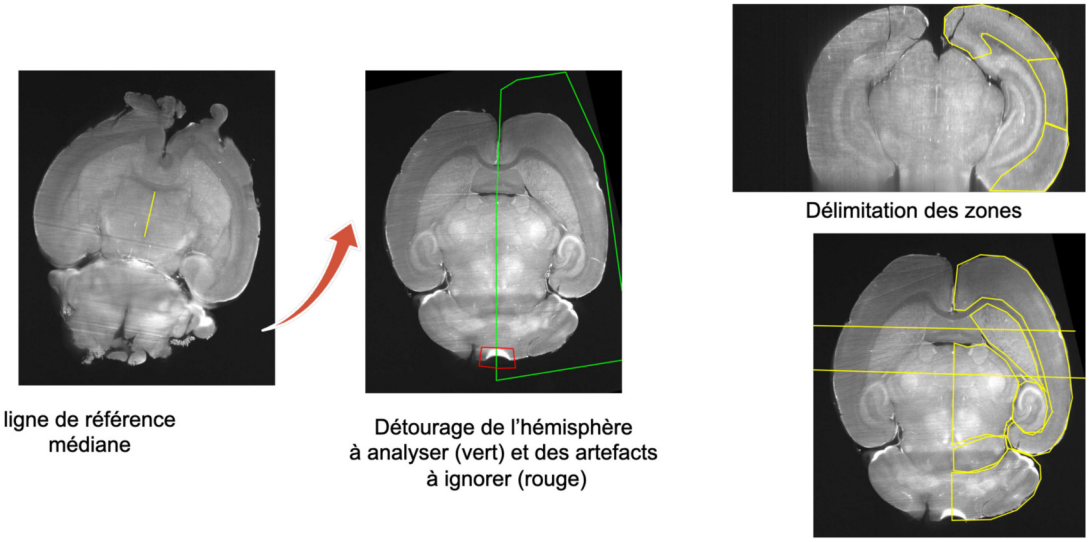
Le logiciel Fiji a été utilisé pour recaler les reconstructions 3D obtenues à partir des acquisitions en microscopie à feuille de lumière dans un espace normalisé. Pour ce faire, une ligne de référence a été tracée pour chaque cerveau entre deux points de repère facilement identifiables, correspondant

aux extrémités dorsales de la partie ventrale du troisième ventricule. La direction de la ligne a été utilisée pour faire pivoter les images autour de l'axe z orthogonale aux images, de sorte que tous les cerveaux aient la même orientation (Image 7). La longueur de la ligne a été utilisée pour mettre à l'échelle les images, afin que tous les cerveaux aient la même taille. Enfin, la position de la ligne a donné une référence de position dans l'espace. Nous avons supposé que tous les cerveaux étaient à plat dans le microscope et ne présentaient aucune rotation autour des axes x et y.

b) DÉVELOPPEMENT DE L'ATLAS DU CERVEAU DE SOURIS À P7

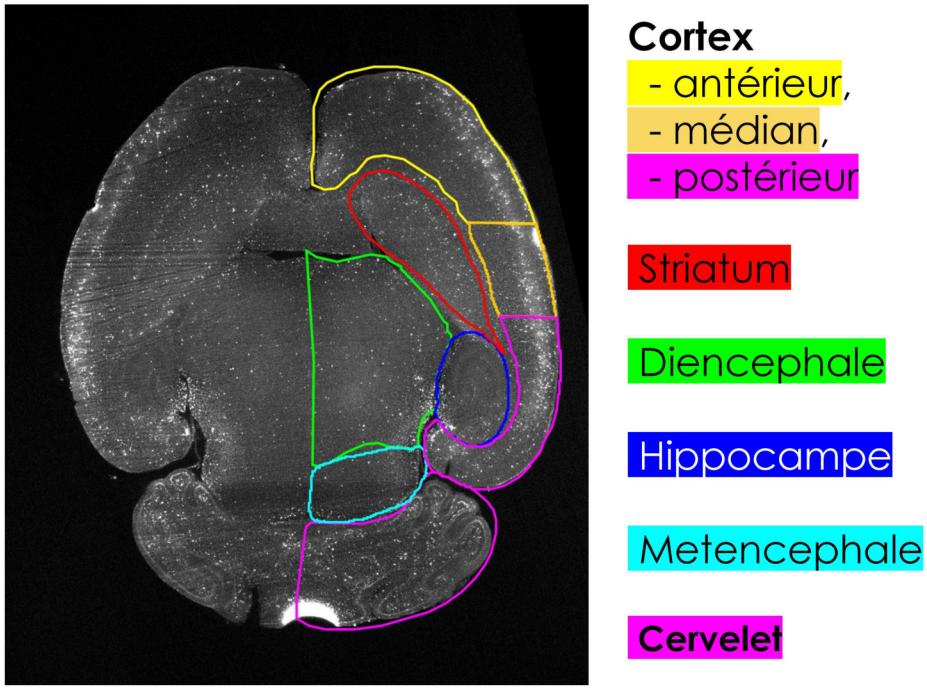
Afin de préciser la distribution anatomique des cellules positives à la c-caspase-3, nous avons développé un atlas numérique du cerveau de la souris P7 permettant un enregistrement et une segmentation semi-automatiques. Le logiciel Fiji a été utilisé pour créer cet atlas du cerveau de la souris à P7. Les régions ont été dessinées manuellement sur 50 coupes horizontales, à l'exception des cortex dorsal, latéral et ventral où les régions ont été dessinées sur 30 coupes coronales. Les sept régions cérébrales suivantes ont été définies pour la segmentation : le myélencéphale, le métencéphale, le diencéphale, l'hippocampe, le néocortex, le striatum et le cervelet (Image 8). Le logiciel Matlab a ensuite été utilisé pour le traitement des images après reconstruction volumétrique de l'atlas par un processus d'interpolation.

Image 7 : Processus de développement de l'atlas 3D utilisé pour la segmentation anatomique des cerveaux P7



Retour au texte

Image 8 : Régions cérébrales définies lors du développement de l'atlas au stade de développement P7



Retour au texte

c) ANALYSE DES IMAGES TRIDIMENSIONNELLES

Les images ont tout d'abord été segmentées à l'aide d'un seuil défini par l'utilisateur pour séparer le cerveau du bruit de fond sur une version floutée de l'image (filtre gaussien, sigma = 10 vx). Le niveau de bruit a été déterminé en utilisant les 16ième et 84ième percentiles de la distribution des valeurs des pixels à l'intérieur du cerveau (± 1 sigma). Un filtre passe-haut a ensuite été appliqué aux images (soustraction d'une version floutée de l'image à l'aide d'un filtre gaussien, sigma = 6 vx) ainsi qu'un filtre passe-bas (filtre gaussien, sigma = 1 vx). Après ce processus, chaque voxel ayant une valeur supérieure à 2 sigma de bruit a été considéré comme un voxel positif pour la c-caspase 3. La division des voxels positifs par le nombre total de voxels dans chaque région a donné les résultats finaux, exprimés en pourcentage de volume de cerveau marqué.

D. IMMUNOHISTOCHIMIE SUR TRANCHE DE CERVEAU

1. PRÉPARATION DES TISSUS

Les échantillons fixés ont été rincés avec du PBS et des sections de 30 µm d'épaisseur ont été obtenues à l'aide du vibratome Leica VT1000S.

2. IMMUNOMARQUAGE

Pour déterminer le phénotype des cellules identifiées comme apoptotiques, différents co-marquages ont été appliqués en utilisant les anticorps primaires suivants :

- anti-caspase-3 clivée polyclonal de lapin (1:400 - Cell Signaling), marqueur de cellules apoptotiques ;
- anti-noyaux neuronaux polyclonal de poulet (NeuN - 1:500 - Synaptic Systems), marqueur des neurones post mitotiques ;
- anti-glutamate-décarboxylase isoforme 67 monoclonal de souris (GAD67, 1:1000 - Millipore), marqueur des neurones GABAergiques
- anti-SRY (Sex Determining Region Y) -box 10 (Sox10, 1:1000 - Novus), marqueur des oligodendrocytes ;
- anti-protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) (1:1000 - Abcam), marqueur des astrocytes.

Les anticorps secondaires suivants, marqués par des fluorophores, ont été utilisés :

- anti-lapin conjugué Cy3 (1:500 - Jackson ImmunoResearch) ;
- anti-poulet conjugué Alexa 680 (1:500 - Jackson ImmunoResearch) ;
- anti-souris conjugué Alexa 488 (1:500 - Invitrogen).

3. IMMUNOHISTOCHIMIE

Les sites de fixation non spécifiques d'anticorps ont été bloqués en incubant les tranches de cerveau pendant 1 heure à température ambiante avec une solution tampon de PBS / 5% (v/v) de sérum d'âne normal / 0,5% (v/v) de sérum d'albumine bovine (BSA), 0,1% (v/v) de Tween-20 avant incubation pendant une nuit à 4°C avec les anticorps primaires (PBS1X, 0,5% de BSA, 0,1%, T20). Après trois lavages dans du PBS, les sections ont été incubées pendant 1 heure à température ambiante avec les anticorps secondaires complémentaires. Les noyaux ont été colorés avec une solution de Hoechst-33342 (Sigma) diluée à 1:1000 dans du PBS pendant 10 minutes. Après trois lavages au PBS, les sections ont été montées dans un milieu de montage à base de glycérol (Dako).

4. IMAGERIE MICROSCOPIQUE SUR TRANCHES DE CERVEAU

Les images d'immunofluorescence ont été générées à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser Leica SP8-UV (PL-APO 10X, 0,4 NA, milieu d'imagerie Leica) pour les tranches de cerveau des souris P7 marquées conjointement pour NeuN et GAD67, ou d'un microscope Zeiss AxioImager Z1 (PL-NEO 10X, 0,3 NA) pour les tranches de cerveau des souris P7 marquées conjointement pour Sox10 et GFAP. Les filtres d'émission et d'excitation propres à chaque fluorophore ont été utilisés séquentiellement : Cy3 excitation 545/25 nm et émission 605/70 nm, Alexa 680 excitation 665/45 nm et émission 725/50 nm, Alexa 488 excitation 475/40 nm et émission 530/50 nm.

Le logiciel Fiji a été utilisé pour le traitement des images et la quantification des marquages immunohistochimiques. Les couches corticales ont été déterminées sur les images comprenant le marquage Hoechst-33342.

L'extension *General Cell Counter* [149], un plugin développé lors de ce projet et permettant le pré-traitement des images et le comptage des cellules, a été utilisé pour la quantification des cellules exprimant la c-caspase-3 (Image pixel size (µm) : 0,645, paramètres d'extension : Threshold method : Auto Local Threshold - Mean, Gaussian high pass sigma (µm) : 8, Median filter radius (px) : 0, Local Threshold radius (px) : 25, Offset : -30, Cell area range (µm²) : 15-140, Cell circularity range : 0.1-1.0, Minimal distance (µm) : 1). Les cellules coexprimant la c-caspase-3 avec d'autres marqueurs ont été comptées manuellement.

E. ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Graph Pad Prism, version 9.5.1 (Graph Pad Software, La Jolla, CA, États-Unis). La normalité de la distribution des variables continues a été testée par le test de Shapiro-Wilk. Le test bilatéral de Mann-Whitney U a été utilisé pour comparer les moyennes de deux groupes de variables indépendantes. L'analyse de variance unilatérale de Friedman (ANOVA) suivie du test de Dunn ont été utilisés pour comparer les trois conditions appariées. Les données sont présentées sous forme de médiane [IQR]. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

IV RÉSULTATS

Les résultats issus des travaux réalisés sur la population de souris néonatale présentés ci-dessous ont été publiés dans la revue internationale *Scientific Reports.* L'article correspondant [150] est présenté en annexe 1.

A. CARTOGRAPHIE ET QUANTIFICATION SUR CERVEAU ENTIER DE L'APOPTOSE INDUITE PAR L'ANESTHÉSIE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT CÉRÉBRAL POSTNATAL

Nous avons, dans la première étape de ce travail, établie une cartographie de l'apoptose induite par l'exposition au sévoflurane sur cerveaux entiers de souris. Pour ce faire, 26 souris ont été assignées au hasard à l'un des deux groupes d'étude, à savoir - le groupe sévoflurane - ou - le groupe contrôle -, à trois stades différents de développement postnatal : néonatal au 7ième jour de vie (P7) (n=16), juvénile à P21 (n=5) ou adulte à P49 (n=5). Les animaux assignés au groupe sévoflurane ont été exposés à 3 % de sévoflurane pendant trois périodes consécutives de deux heures. Les animaux témoins ont été exposés à de l'oxygène pur pendant la même durée et dans les mêmes conditions. Tous les animaux ont terminé l'expérimentation. Immédiatement après la fin de la période d'exposition, les cerveaux ont été prélevés. Une fois transparisés et immunomarqués selon la méthode i-DISCO+[147], les cerveaux entiers ont été imagés à l'aide d'un microscope à feuille de lumière et le volume de cellules marquées (c-caspase-3 - marqueur de la mort cellulaire programmée) a été quantifié (voir Chapitre III.C. Méthode i-DISCO+).

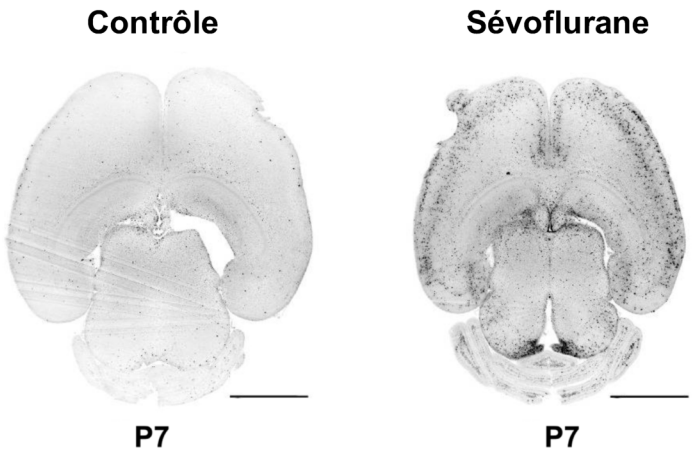
Dans le groupe témoin, l'immunomarquage de la c-caspase-3 était détecté dans 0,50 [0,48-0,92] % du volume cérébral des souris P7 et avait tendance à être plus faible à P21 (0,30 [0,21-0,37] %) et P49 (0,16 [0,05-0,27] %). Dans le groupe sévoflurane, la fraction volumique de la c-caspase-3 augmentait de manière significative par rapport au groupe témoin lors d'une exposition en période néonatale à P7, atteignant 1,63 [1,56–1,77] % (p=0,003) du volume cérébral. En revanche, lors d'une exposition au sévoflurane en périodes juvénile (P21) et adulte (P49), les fractions volumiques des cellules apoptotiques restaient similaires à celles des groupes contrôles non exposés. (Figure 9). La visualisation 3D du marquage c-caspase-3 sur cerveau entier exposé (à droite) et non exposé (à gauche) au sévoflurane à P7 est consultable en suivant ce lien *(mettre en qualité HD avec la roue dentée en bas de la vidéo)*.

L'augmentation significative de l'apoptose après exposition au sévoflurane à P7, non retrouvée chez les animaux exposés à un stade de développement plus matures, à savoir P21 et P49, suggèrent une sensibilité accrue de la période néonatale.

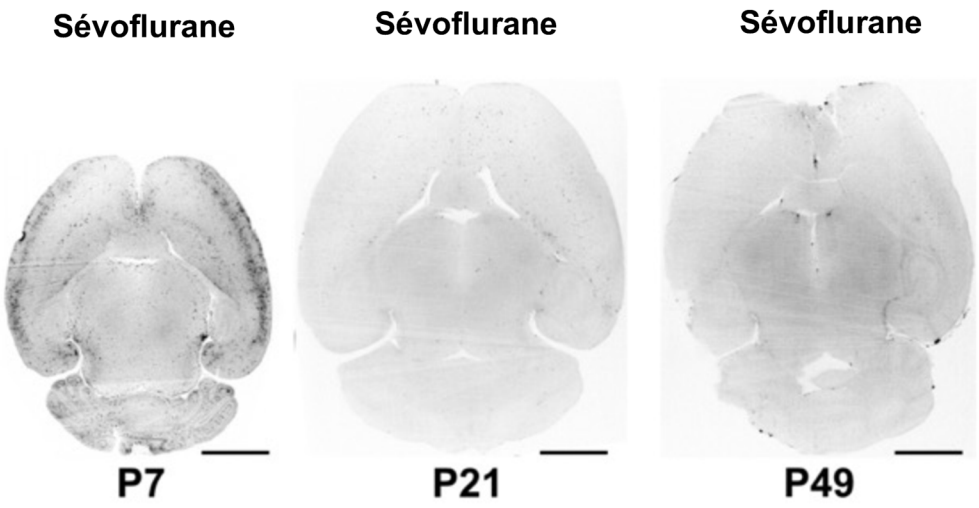
Pour la suite de ce projet, et après avoir confirmé une mort cellulaire accrue et diffuse chez la souris exposée au sévoflurane à P7, nous nous sommes concentrés sur cette période de vulnérabilité néonatale afin de définir la distribution anatomique et les caractéristiques histologiques des cellules apoptotiques.

Figure 9. Cartographie de l'apoptose dans l'ensemble du cerveau après une anesthésie au sévoflurane.

A. Exemples d'images de fluorescence de l'immunomarquage de la c-caspase-3 dans le cerveau de souris après exposition ou non au sévoflurane à P7.

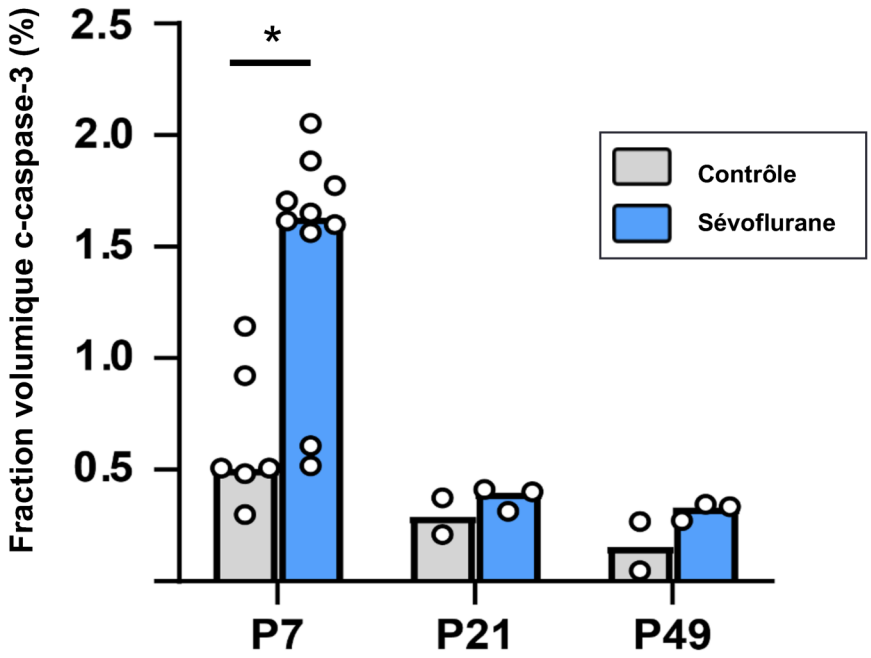


B. Exemples d'images de fluorescence de l'immunomarquage de la c-caspase-3 dans le cerveau de souris après exposition au sévoflurane à P7, P21 et P49.



Les barres d'échelle représentent 2 mm

C. Quantification des volumes d'immunomarquage de la c-caspase-3 dans le cerveau entier.



*La médiane des données est représentée ; * p ≤ 0.01.*

Retour au texte

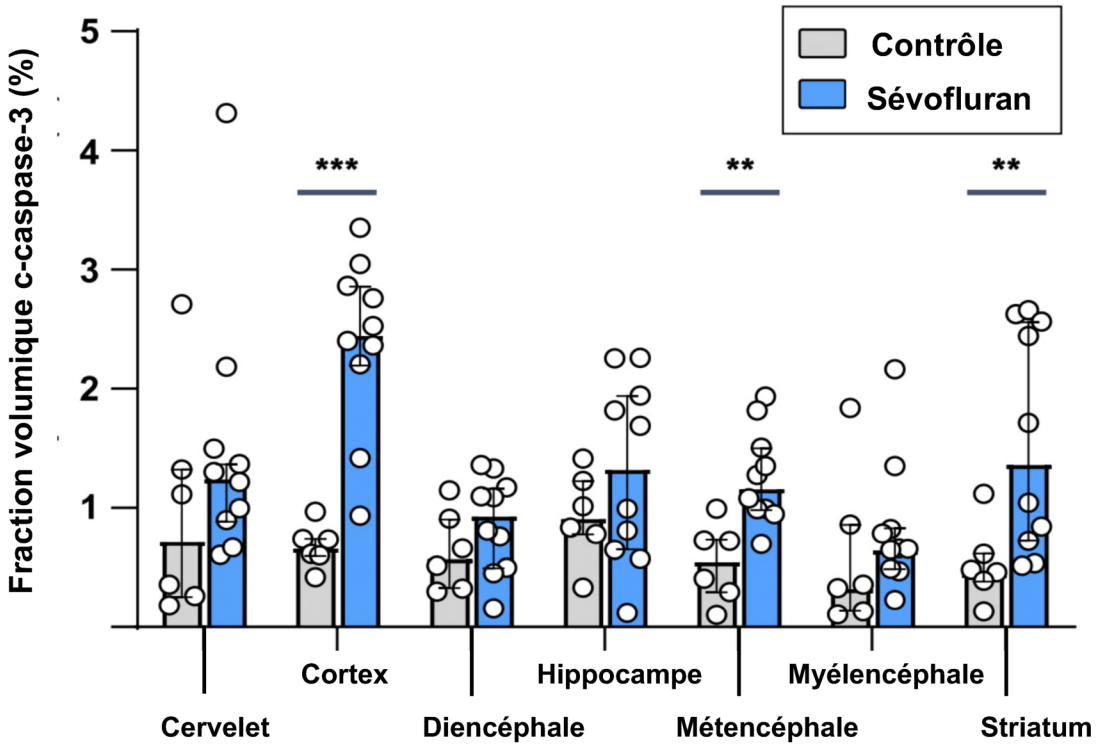
B. DISTRIBUTION ANATOMIQUE DE L'APOPTOSE INDUITE PAR L'ANESTHÉSIE EN PÉRIODE NÉONATALE

Afin de caractériser la distribution anatomique des cellules positives à la c-caspase-3 après exposition au sévoflurane en période néonatale, nous avons développé un atlas numérique du cerveau de souris à P7. Cette étape était nécessaire pour permettre l'enregistrement et la segmentation de manière semi-automatiques, et le comptage automatique des voxels positifs. En effet, au moment de ce projet, il n'existait pas d'atlas disponible en coupe coronale pour le cerveau de souris au stade de développement P7.

Après exposition au sévoflurane, la fraction volumique de la c-caspase-3 augmentait de manière significative dans le néocortex (2,47 [2,21-2,86] vs 0,68 [0,60 -0,74] % ; p = 0, 0005), ainsi que dans le striatum (1,38 [0,72-2,57] vs 0,47 [0,39-0,62] % ; p = 0,01), et dans le métencéphale (1,18 [0,99-1,51] vs 0,56 [0,29-0,73] % ; p = 0,008) (Figure 10). Dans les autres régions cérébrales, la fraction volumique de la c-caspase-3 montrait une tendance à l'augmentation, sans atteindre le seuil de la significativité statistique.

Ces résultats suggèrent que l'apoptose intense et diffuse observée après exposition au sévoflurane en période néonatale, est variable en fonction des régions cérébrales considérées. Le néocortex apparaissait ici comme la zone cérébrale la plus sévèrement touchée par l'apoptose cellulaire induite par l'exposition au sévoflurane

Figure 10 : Distribution et quantification anatomique de la fraction volumique de l'immunomarquage c-caspase-3 à P7.



La médiane des données est représentée (± IQR).
Groupe Contrôle n = 6 Groupe Sévoflurane n = 10
*** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001.*

Retour au texte

C. DISTRIBUTION SPATIALE INTRA-CORTICALE DES CELLULES APOPTOTIQUES DU NÉOCORTEX EN PÉRIODE NÉONATALE

La distribution spatiale intra-corticale des cellules affectées par l'apoptose induite par l'exposition à l'anesthésie à P7 sur tranches de cerveaux a ensuite été caractérisée.

Les immunomarquages ont montré des gradients macroscopiques de cellules apoptotiques suivant les axes corticaux antéro-postérieurs et ventro-dorsaux. La fraction médiane du volume de cellules marquées par la c-caspase-3 était de 1,79 [1,69-2,43] % dans le cortex antérieur, significativement plus faible que dans le cortex médian (2,70 [2,32-3,11] % ; p = 0,04) et le cortex postérieur (2,94 [2,68-3,14] % ; p = 0,01). De même, le volume de cellules marquées par la c-caspase-3 était plus faible dans le cortex ventral (1,62 [1,26-1,78] %) que dans les cortex latéral (2,56 [2,15-2,77] % ; p = 0,04) et dorsal (2,88 [2,56-3,35] % ; p = 0,0001). Ces résultats sont représentés dans la Figure 11.

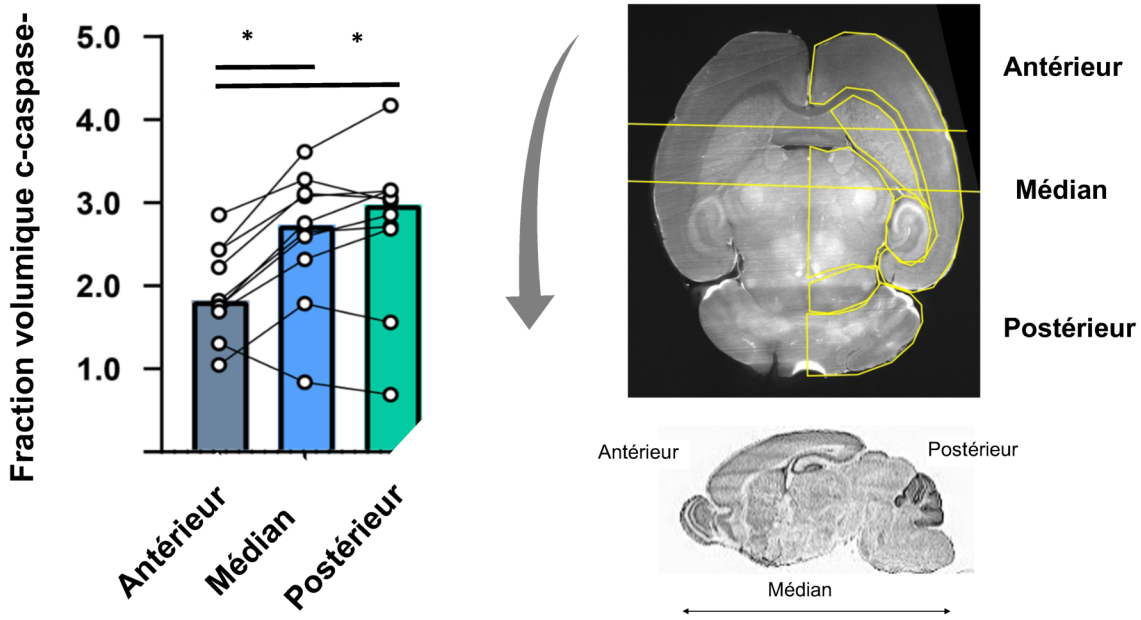
Des gradients intra-laminaires entre les différentes couches du cortex suivant l'axe ventro-dorsal ont également été mis en évidence. Dans le cortex dorsal, la majorité des cellules positives à la c-caspase-3 (51,1 [43,5-60,0] %) étaient situées dans la couche superficielle granulaire externe II. À l'inverse, dans le cortex ventral, les couches profondes pyramidales internes et polymorphes V-VI contenaient la plus grande proportion de cellules positives à la c-caspase-3, représentant 38,1 [21,4-50,0] % des cellules marquées. La couche superficielle II apparaissait moins affectée, ne représentant qu'un quart des cellules c-

caspase-3 positives (Figure 12). Aucune différence n'a été constatée suivant l'axe antéro-postérieur

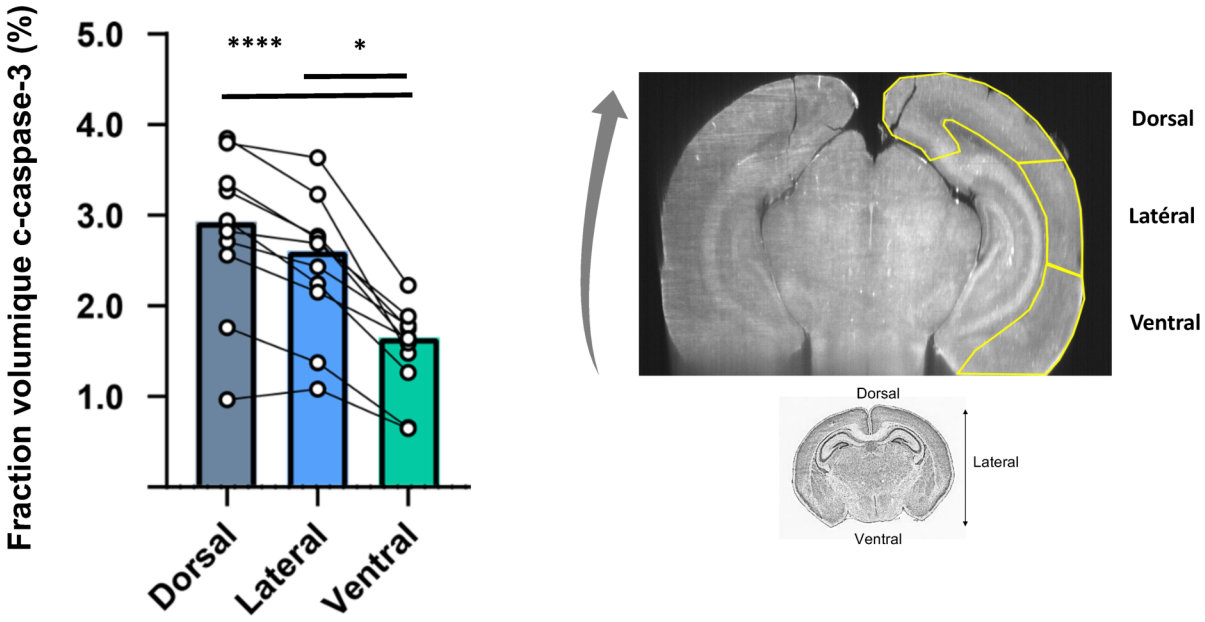
Ces résultats suggèrent une grande variabilité de la vulnérabilité du cortex néonatal au sévoflurane en fonction des différentes zones corticales considérées. Dans ce travail, la couche superficielle du néocortex postéro-dorsale est apparue la plus touchée par l'apoptose induite par le sévoflurane.

Figure 11 : Distribution spatiale de l'apoptose néocorticale après anesthésie au sévoflurane à P7.

A. Gradients anatomiques de la fraction volumique de c-caspase-3 selon l'axe antéro-postérieur, n = 10.



B. Gradients anatomiques de la fraction volumique de c-caspase-3 selon l'axe ventro-dorsal, n = 10.

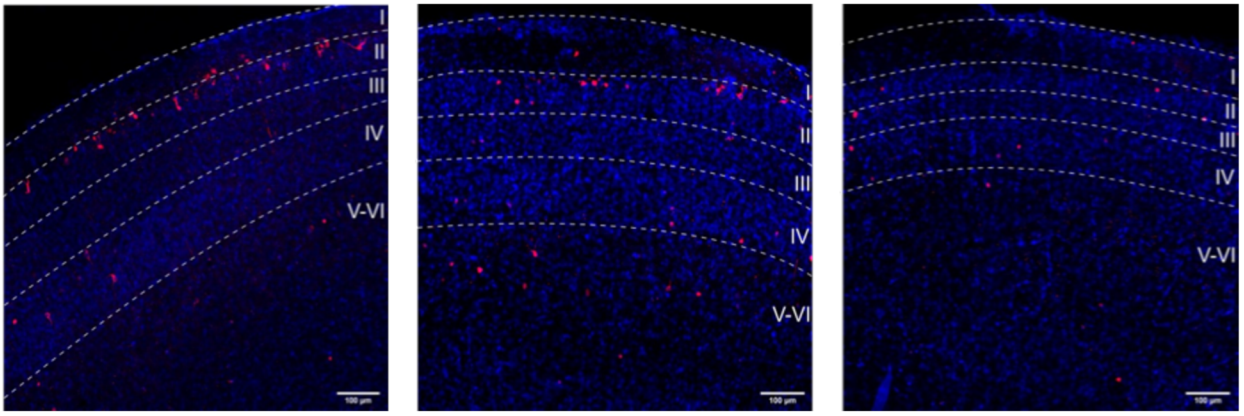


*La médiane des données est représentée (± IQR) ; * p ≤ 0.05; **** p ≤ 0.0001*

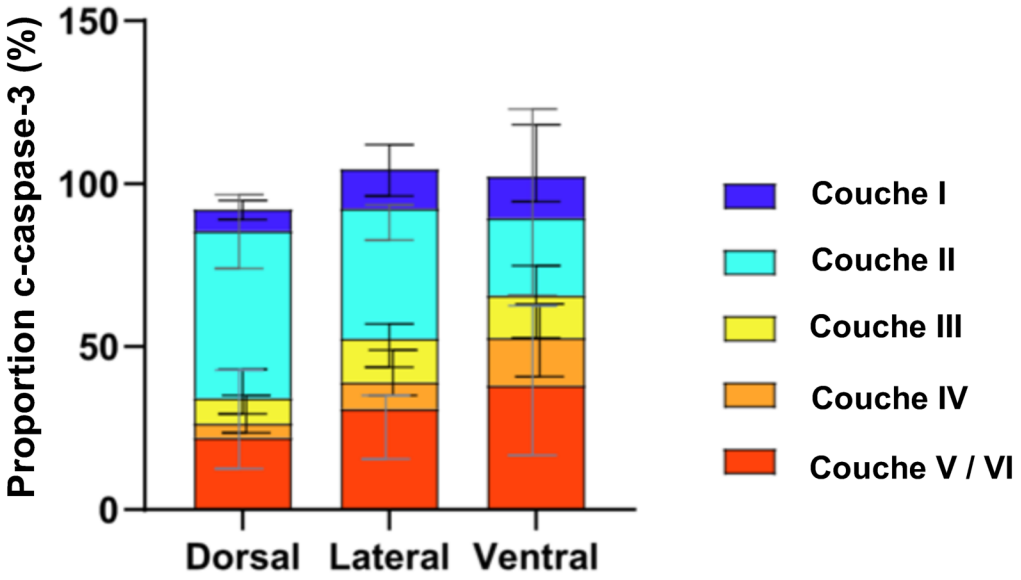
Retour au texte

Figure 12 : Distribution intra-corticale de l'apoptose après anesthésie au sévoflurane à P7.

A. Exemples d'images de fluorescence acquises dans le néocortex montrant la distribution intra-corticale des cellules positives à la c-caspase-3.



B. Quantification de la distribution intra-corticale des cellules positives à la c-caspase-3, n = 14 (dorsal), 15 (latéral), 10 (ventral).



La médiane des données est représentée (± IQR).

Retour au texte

D. CARACTÉRISATION HISTOLOGIQUE DES CELLULES APOPTOTIQUES DU NÉOCORTEX EN PÉRIODE NÉONATALE

Pour finir, la caractérisation de la nature histologique des cellules affectées par l'apoptose induite par l'exposition à l'anesthésie en période néonatale a été recherchée à l'aide de co-marquages associant la c-caspase-3 et des immuno-marqueurs spécifiques des neurones post mitotiques, des neurones GABAergiques, des oligodendrocytes et des astrocytes.

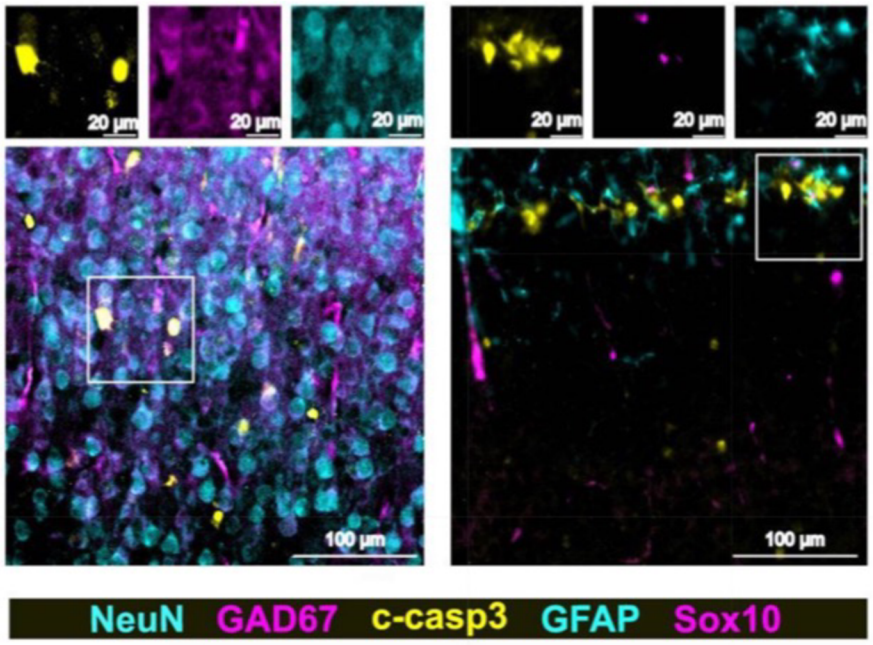
La grande majorité des cellules apoptotiques, soit 69,7 %, était positive au NeuN (neurones post mitotiques), dont 24,6 % étaient co-marquées avec le marqueur GABAergique GAD67. Le marquage des cellules gliales ne représentait que 0,87 % des cellules positives à la c-caspase-3. Parmi celles-ci, 0,645 % étaient de cellules astrocytaires (marqueur GFAP) et 0,223 % des oligodendrocytes (marqueur Sox10) (Figure 13).

Les 30 % de cellules positives à la c-caspase-3 restantes ne présentaient aucun co-marquage avec les marqueurs utilisés dans ce travail.

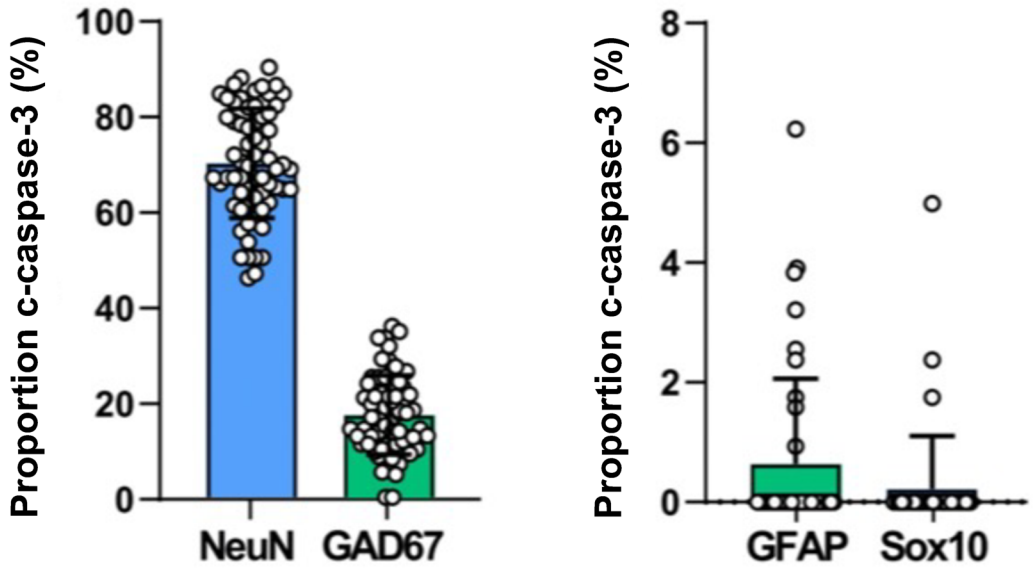
Ces données suggèrent que l'apoptose induite par le sévoflurane touche principalement les neurones post-mitotiques, dont 24,6 % sont des neurones GABAergiques. En revanche, les cellules gliales, tant les oligodendrocytes que les astrocytes, ne semblent pratiquement pas affectées

Figure 13 : Caractérisation de l'apoptose néocorticale après anesthésie au sévoflurane à P7.

A. Exemples d'images de fluorescence acquises après immunomarquage pour la caractérisation intra-corticale des cellules positives à la c-caspase-3. Les encadrés montrent des images à plus fort grossissement dans des canaux uniques.



B. Quantification de la fraction des cellules corticales co-marquées avec la c-caspase-3, n = 65 (gauche), 41 (droite).



Les données sont exprimées en moyenne (± s.d.).

Retour au texte

V DISCUSSION

Les anesthésiques généraux sont chaque jour utilisés chez des milliers d'enfants pour permettre la réalisation d'interventions chirurgicales ou de procédures diagnostiques dans des conditions optimales. L'effet potentiellement neurotoxique de l'exposition aux AA sur le neurodéveloppement reste cependant un des problèmes de sécurité le plus largement médiatisé et le plus fortement controversé auquel est confronté la communauté des anesthésistes pédiatriques depuis une vingtaine d'années. En effet, les données expérimentales des deux dernières décennies ont conduit la FDA à publier, dans une communication sur la sécurité du médicament, un avertissement soulignant le fait qu'« une utilisation répétée ou prolongée d'agents anesthésiques ou sédatifs chez les enfants de moins de 3 ans ou les femmes enceintes pendant leur troisième semestre de grossesse pouvait affecter le développement neuro comportemental des enfants » [24,25] (voir Chapitre I 4 a – De nouvelles interrogations). Malgré la reproductibilité des résultats expérimentaux sur laquelle est basée cette alerte de la FDA, notamment une apoptose diffuse induite par l'exposition aux AA en période néonatale, il n'existe aucune preuve d'un lien de causalité entre cette mort cellulaire accrue et la survenue de troubles persistants du neurodéveloppement. Il est par ailleurs difficile de transposer les résultats expérimentaux à la clinique en raison des limites éthiques de l'expérimentation humaine et de la multitude de biais et facteurs de confusion des études cliniques, rétrospectives pour la grande majorité (voir Chapitre I 4 b – Données

cliniques). Il est de fait indispensable que les travaux de recherches expérimentaux se poursuivent [151].

Dans ce travail, une approche innovante, permettant une analyse exhaustive de cerveaux de souris entiers transparisés, nous a permis d'établir une cartographie de la mort cellulaire induite par l'exposition au sévoflurane au cours du développement. Une augmentation significative de l'apoptose a été mise en évidence lors d'une exposition en période néonatale (P7), non retrouvée lors d'une exposition aux cours des stades de développement ultérieurs juvénile (P21) ou adulte (P49). Le néocortex des animaux exposés à P7 était tout particulièrement affecté. La distribution des cellules apoptotiques n'était cependant pas uniforme au sein du cortex : un gradient apoptotique à la fois cortical et intra-laminaire a été observé. Les couches profondes (V-VI) semblaient plus touchées dans le cortex ventral tandis que les couches superficielles (II) étaient principalement affectées dans le cortex dorsal. Enfin, la caractérisation cytologique a montré que la plupart des cellules apoptotiques étaient des neurones post-mitotiques, dont environ un quart étaient GABAergiques.

A. MÉTHODOLOGIE I-DISCO+

La méthode i-DISCO+ de transparisation d'échantillons immunomarqués [147] utilisée dans ce projet présente plusieurs avantages (voir Chapitre III – Méthodologie). Tout d'abord, elle est exempte de biais anatomique, en permettant l'analyse de cerveaux entiers et intactes sans découpe préalable. En effet, la grande majorité des études ayant exploré la neurotoxicité induite par les anesthésiques ont procédé sur tranche de cerveau, avec une analyse spatiale le plus souvent limitée à quelques régions d'intérêt souvent définies *a priori*. Par ailleurs, l'imagerie de fluorescence à feuille de lumière permet une acquisition tridimensionnelle à haute résolution sans passer par les étapes longues et fastidieuses de reconstruction à partir de coupes sériées. Un processus d'analyse largement automatisé et indépendant de l'utilisateur garantit ici une reproductibilité élevée et un gain de temps important. Toutefois, il convient de noter que la sensibilité habituellement atteinte dans les tranches de cerveaux est probablement plus élevée que celle obtenue ici. Il serait possible d'augmenter cette sensibilité, d'une part, en utilisant une résolution d'acquisition plus élevée, mais en obtenant un volume de données plus important dans un temps d'acquisition plus long, et d'autre part, en fixant un seuil de signal à une valeur plus basse, tout en acceptant une spécificité plus faible.

B. VULNÉRABILITÉ DE LA PÉRIODE NÉONATALE

Nos résultats rapportent une fenêtre étroite de susceptibilité à l'apoptose après exposition à l'AG : seuls les animaux exposés au sévoflurane à P7 présentaient une apoptose accrue comparativement au groupe contrôle. Les données de la littérature [27,108,111,117–121] ont quasi toutes unanimement rapporté des résultats similaires, avec les agents interférant avec les transmissions glutamatergiques et/ou GABAergiques, incluant le sévoflurane et les autres principaux AA courants (kétamine, propofol …). Cette mort cellulaire induite par les AA dépasse de loin les niveaux observés dans le cadre de la mort cellulaire programmée développementale, et apparait maximale entre P5 et P9 pour devenir négligeable au-delà de P14 chez le rongeur (voir Chapitre 1.C.3. Neurotoxicité des agents anesthésiques). Cette période de vulnérabilité accrue aux AA coïncide avec une période ontogénique spécifique de synaptogenèse intense observée au cours des deux premières semaines postnatales chez le rongeur. C'est au cours de cette même période d'assemblage et de maturation des circuits neuronaux que la plus intense vague d'apoptose physiologique est observée : cet équilibre entre synaptogenèse et mort cellulaire programmée apparait essentielle pour éliminer les neurones excédentaires ou intégrés de manière inappropriée dans le réseau et maintenir le nombre optimal de connexions synaptiques fonctionnelles (voir Chapitre I C 1– Mort cellulaire physiologique). Compte tenu de la variabilité inter espèce, le fait que les AG puissent induire une neurodégénérescence importante chez les rongeurs au cours des premières semaines postnatales étendrait cette période de vulnérabilité aux premières années de la vie postnatale chez l'homme.

C. VULNÉRABILITÉ DU NÉOCORTEX

Les études antérieures ayant analysé l'effet de l'exposition à l'anesthésie au cours du développement du cerveau, réalisées pour la plupart sur tranches de cerveaux, se sont principalement concentrées sur des régions ou des structures cérébrales spécifiques : diverses régions du cerveau, corticales et sous-corticales, se sont révélées affectées, à des degrés divers, par cette apoptose cellulaire induite par les AA [26,30,115,118,120,126]. Parmi les régions cérébrales les plus vulnérables on retrouvait les noyaux thalamiques et le cortex pariétal. D'autres régions, notamment le cortex cingulaire et l'hippocampe, ont également été concernées [115]. La présente étude confirme les conclusions d'études antérieures montrant une vulnérabilité particulière du néocortex à la mort cellulaire induite par l'exposition à l'anesthésie à P7. Dans une moindre mesure, nous rapportons une apoptose accrue après exposition au sévoflurane à P7 au niveau du striatum et du métencéphale. En revanche, nous n'avons mis en évidence aucune atteinte significative au niveau de l'hippocampe.

Ces résultats contrastent avec certaines données de la littérature, notamment réalisées sur tranches de cerveaux. L'exposition de souris P7 à de l'isoflurane 1,5% pendant 6 h était associée à une atteinte significative du cortex touchant également l'hippocampe [118]. Sur un autre modèle de souris exposée à 3h d'isoflurane 1,5% à P3, P5 et P7, une augmentation significative de l'apoptose était retrouvée au niveau du cortex et dans toutes les régions de l'hippocampe, sans aucune atteinte du striatum [111]. Ces divergences peuvent résulter de biais liés à l'analyse sur tranches de cerveaux, notamment du fait d'un échantillonnage incomplet ou d'une sélection prédéfinie limitée de

structures à analyser. L'utilisation de différentes souches de souris ou de modalités anesthésiques différentes pourraient également conduire à ce type de variabilité entre les études. Dans les études mentionnées ci-dessus, l'isoflurane a été utilisé à la place du sévoflurane. Or, la comparaison de l'effet de l'exposition à des doses équipotentes de ces deux agents anesthésiques halogénés chez la souris P7 était associée à une neurodégénérescence significativement plus marquée avec l'isoflurane [133]. En outre, l'importance relative des dommages dans une zone par rapport à une autre semble varier en fonction de l'âge de l'animal au moment de l'exposition [152]. Ainsi de légères variations dans l'âge d'exposition des souris sont susceptibles de produire des profils lésionnels différents.

D. APOPTOSE DÉVELOPPEMENTALE ET APOPTOSE INDUITE PAR LE SÉVOFLURANE

Guidée par la cartographie initiale réalisée sur le cerveau entier, nous avons ciblé notre analyse sur le néocortex des animaux P7. Nous avons précisé la distribution anatomique de l'apoptose induite par le sévoflurane et sa caractérisation histologique. Le marquage cortical de la c-caspase-3 est apparue inhomogène au sein du cortex mais également entre les différentes couches corticales. Nous avons observé d'une part un gradient le long des axes corticaux antéro-postérieur et ventro-dorsal et d'autre part une atteinte différentielle au sein des différentes couches corticales en fonction des régions considérée (cortex dorsal, latéral ou ventral). Par ailleurs, la grande majorité des cellules apoptotiques observées après exposition au sévoflurane en période néonatale se sont révélées être des neurones post-mitotiques. Ces résultats confirment la littérature existante [108,114,126,153,154] et suggèrent, d'une part une variabilité de la vulnérabilité du cortex néonatal au sévoflurane en fonction des zones corticales considérées et d'autre part une sensibilité accrue des neurones post mitotiques à l'exposition aux AA en période néonatale.

Il a déjà été évoqué plus haut que la période critique de vulnérabilité aux AA semblait coïncider avec le pic de synaptogénèse et la vague de mort cellulaire programmée associée, qui se déroulent au cours des deux premières semaines postnatales chez le rongeur [27,30,108,111,117–123]. L'ampleur et la temporalité de la mort cellulaire programmée n'apparait cependant pas uniforme dans l'ensemble du cerveau [91,101,155]. Au cours des premiers stades du développement, en condition physiologique, les travaux de Blanquie et al. [101] ont par exemple montré des différences importantes de la densité des

neurones apoptotiques entre les cortex primaires moteur et sensitif, deux zones adjacentes mais fonctionnellement distinctes. Cette disparité était également observée entres les différentes couches laminaires au sein d'une même aire corticale. Enfin, les différences dans le taux d'apoptose entre les 2 aires fonctionnelles distinctes sont apparues directement corrélées à leur niveau d'activité respectif. En effet, comme rapporté par ailleurs [91,98–102] (voir Chapitre I.C.1 et 2 – Mort cellulaire physiologique et Balance excitation / inhibition), l'activité électrique est un facteur critique de la survie neuronale au cours de de la mort cellulaire programmée développementale.

La question qui se pose alors est de savoir si l'apoptose induite par les AA, dont on sait qu'ils ont des effets puissants sur l'activité électrique et la transmission synaptique (voir ChapitreI.B.2. b – Cibles moléculaire des agents anesthésiques), affecte la même population cellulaire que celle impliquée dans l'apoptose développementale physiologique. De précédents travaux ont cherché à préciser les profils apoptotiques du cortex somato-sensoriel, en condition physiologique et après exposition à l'anesthésie, chez des souris exposées ou non en période néonatale (de P5 à P9) à une anesthésie par sévoflurane. Comme attendu, l'apoptose était significativement accrue dans le groupe exposé comparativement au groupe contrôle ; mais surtout, cette apoptose présentait des profils de distribution laminaire intra corticale similaires chez les animaux exposés et non exposés à l'anesthésie. Plus précisément, à P5, les cellules apoptotiques (c-caspase-3 positives) étaient, de façon identique dans les groupes exposés et contrôle, principalement localisées dans la couche V tandis qu'à P9 elles étaient principalement localisées dans les couches II - IV. Dans le groupe P7, les profils apoptotiques étaient variables, avec des schémas laminaires soit semblables à ceux de P5 soit à ceux de P9,

soit un mélange des deux [154]. Il a par ailleurs été rapporté, qu'en conditions physiologiques, la plupart des neurones pyramidaux subissaient une apoptose maximale entre P2 et P5, tandis que la période de neurodégénérescence apoptotique des interneurones s'est avérée légèrement plus tardive se produisant entre P5 et P10 [99]. Ici encore des profils apoptotiques similaires à l'apoptose physiologique ont été rapportés après exposition au sévoflurane : la caractérisation histologique réalisée au niveau du cortex somato-sensoriel après exposition au sévoflurane à P5 montrait que la plupart des neurones apoptotiques avaient une morphologie typique de neurones pyramidaux tandis que les interneurones GABAergiques représentaient autour de 20% des neurones apoptotiques[154]. En revanche à P9, les neurones apoptotiques GABAergiques représentaient plus de 70% des cellules apoptotiques [154]. Conformément à ces données, nos résultats ont également montré que près de 25 % des neurones post-mitotiques apoptotiques observés après exposition au sévoflurane à P7 étaient GABAergiques.

L'ensemble de ces données suggère que l'exposition aux AA est susceptible d'exacerber l'apoptose neuronale physiologique en suivant des profils de distribution apoptotiques similaires. Les gradients apoptotiques corticaux et laminaires que nous avons observés pourraient ainsi traduire les spécificités temporo-spatiales de la maturation différentielle d'aires corticales fonctionnellement distinctes.

A l'opposé, les cellules gliales représentaient une fraction négligeable des cellules apoptotiques que nous avons observées après exposition au sévoflurane. Contrastant avec ces résultats, des dommages importants impliquants les cellules gliales de la substance blanche ont été rapportées sur des modèles de primates fœtaux et nouveau-nés exposés aux AA [127,128]. Chez

le macaque âgé de 6 jours, l'exposition à l'isoflurane était associée à une apoptose importante localisée dans les substances blanche et grise de l'ensemble du cerveau (52 % des cellules apoptotiques étaient des cellules gliales et 48 % des neurones). Les oligodendrocytes étaient spécifiquement vulnérables, tandis que les progéniteurs oligodendrocytaires, les astrocytes et la microglie étaient épargnés [128]. Par ailleurs, l'exposition à 5h d'isoflurane chez des macaques à des stades développementaux plus tardifs (20 et 40 jours de vie), était associée à une neuro apoptose plus faible (34%) et une atteinte majoritairement oligodendrocytaire (66%). Ces résultats suggèrent ainsi une fenêtre de vulnérabilité différentes pour les neurones et les oligodendrocytes [156]. L'absence de co-marquage des cellules gliales astrocytaires et oligodendrocytaires dans notre travail peut découler de plusieurs facteurs. Tout d'abord, nous n'avons pas effectué de quantification dans la substance blanche puisque la cartographie initiale sur le cerveau entier ne présumait pas d'apoptose à ce niveau. Par ailleurs, comme en témoigne l'apoptose neuronale corticale diffuse associée aux expositions au cours de la première semaine de vie chez les rongeurs, il semble exister des périodes spécifiques de maturation cellulaire où la sensibilité à la neurotoxicité induite par l'anesthésie est augmentée. Contrairement aux neurones, la prolifération des cellules gliales et la myélinisation se produit plus tard chez les rongeurs, principalement entre la deuxième et la troisième semaines de vie [157]. Enfin, les travaux ayant rapporté une toxicité induite par l'anesthésie sur les oligodendrocytes ont été réalisés chez des primates dont le développement cérébral et les processus de maturation suivent une chronologie très différente de celle des rongeurs [155].

En dernier lieu, nous n'avons pas été en mesure de déterminer le type cellulaire d'environ 30% des cellules apoptotiques. On peut supposer qu'elles étaient en cours de différenciation et n'exprimaient pas les marqueurs habituels testés ici.

E. MÉCANISMES CELLULAIRES DE L'APOPTOSE INDUITE PAR LE SÉVOFLURANE

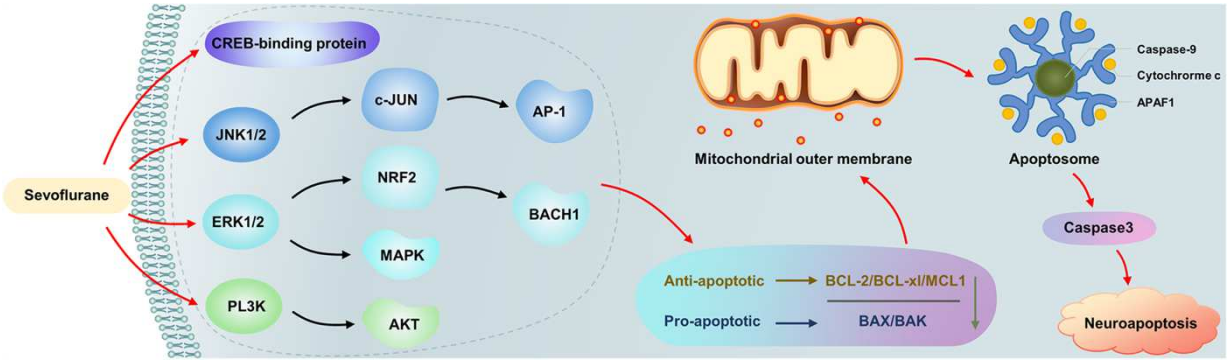
La recherche des mécanismes qui sous-tendent la mort cellulaire induite par l'AG a fait l'objet d'une intense littérature [63,158–160]. Au niveau cellulaire, de nombreux travaux se sont concentrés sur la compréhension de l'implication des différentes voies de l'activation apoptotique, alors considérée comme l'une des principales causes de la mort neuronale induite par le sévoflurane [27,160–162]. La voie intrinsèque de l'apoptose (ou voie mitochondriale) est initiée en réponse à des signaux intra-cellulaires qui entrainent une diminution du ratio facteurs anti-apoptotiques (tel que Bcl-2, Mcl1, Bcl-XL) / pro-apoptotiques (Bax/Bak) à l'origine d'une perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. Cette perméabilisation va favoriser la libération du cytochrome C qui à son tour va entrainer l'activation du clivage des pro-caspases-9 lors de la formation de l'apoptosome aboutissant à l'activation de la caspase-3 effectrice [90]. L'exposition au sévoflurane est apparue comme un facteur modulant l'activité de plusieurs des différentes voies de signalisation intra-cellulaire classiquement impliquées dans la régulation de cette cascade pro-apoptotique (Figure 14) [160,163]. C'est le cas de la voie de signalisation des protéines kinases activées par les mitogènes (MAP Kinases) qui sont impliquées dans un certain nombre d'évènements de la vie de la cellule, comme la prolifération, la différenciation, la migration ou encore la survie cellulaire, mais aussi très liées à la régulation des phénomènes apoptotiques. Cette famille de protéines kinases à sérine-thréonine comprend plusieurs sous-familles dont les kinases régulées par un signal extracellulaire (ERK1/2) et les kinases c-Jun N-terminales (JNK) qui ont toutes deux étés impliquées dans la neurotoxicité

induite par le sévoflurane [160,163]. On peut citer à titre d'exemple les travaux de Yufune et al. [164] qui ont exposé des souris P6 à 6h de sévoflurane 2%. Une augmentation importante des marqueur d'apoptose (poly-(adénosine diphosphate-ribose) polymérase - PARP) était retrouvée chez les animaux exposés. Parallèlement une baisse importante du taux de phosphorylation de ERK1/2 était observée (sans baisse du niveau d'expression totale de ERK 1/2). Afin d'établir une relation entre l'inhibition de la phosphorylation de ERK et l'apoptose, les auteurs ont utilisé un inhibiteur de la phosphorylation ERK (SL327) : la suppression transitoire de la phosphorylation de ERK1/2 reproduisait la neuro apoptose induite par le sévoflurane avec des schémas de distribution apoptotique similaires, notamment au niveau du cortex. Enfin la restauration de la phosphorylation de ERK par l'hydrogène entrainait une diminution de l'apoptose induite par le sévoflurane. Wang et al. ont rapporté des résultats similaires, à savoir que l'exposition au sévoflurane au cours de la phase précoce du développement déprimait la phosphorylation d'ERK1/2 et que la restauration de cette voie de signalisation permettait d'atténuer la neuro-apoptose induite par le sévoflurane [165–167]

Bien d'autres voies ont été impliquées dans la cascade d'événements conduisant à cette perte cellulaire accrue induite par l'anesthésie. L'atteinte de l'intégrité et des fonctions mitochondriales associée à une élévation du stress oxydatif [161,168,169], des modifications de l'homéostasie calcique [170,171] ou encore l'altération des voies de signalisation des facteurs neurotrophiques (Brain-derived neurotrophic factor) [172,173] en sont quelques exemples. La neurotoxicité développementale induite par l'anesthésie impliquerait également des changements fonctionnels complexes dans les réseaux neuronaux qui semblent aller bien au-delà de la seule perte neuronale. La Figure 15 illustre

les nombreux mécanismes, à la fois structurels et fonctionnels, qui ont été mis en cause dans la potentielle neurotoxicité induite par l'anesthésie. Bien qu'on ne sache toujours pas si et comment ces mécanismes interagissent les uns avec les autres, l'exposition aux AA est susceptible d'activer différentes voies impliquées dans le maintien dynamique de l'homéostasie neuronale, tant au niveau cellulaire qu'au niveau du réseau.

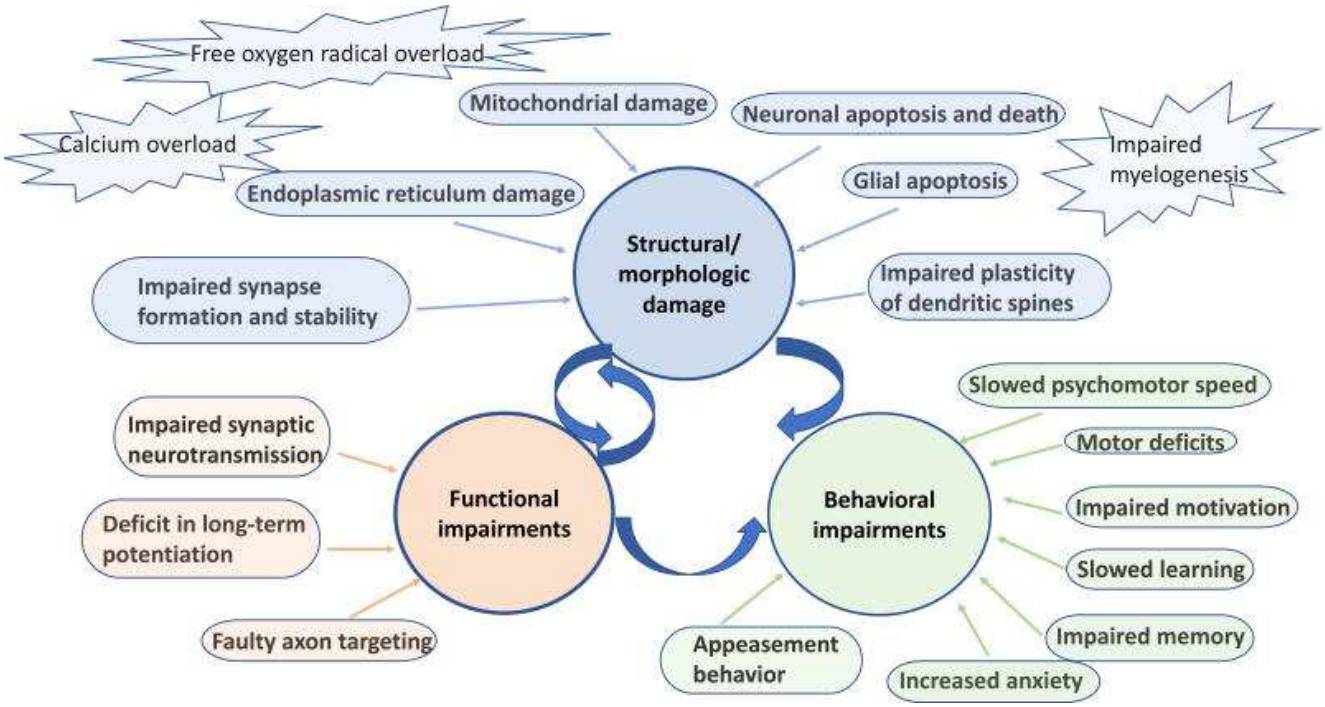
Figure 14 : Aperçu des voies de signalisation supposées de la neuro apoptose développementale associée au sévoflurane *(selon* [160]*).*



L'exposition au sévoflurane du cerveau en développement pourrait induire la neuro apoptose via les différentes voies de signalisation JNK/c-JUN/AP-1, l'axe ERK1/2 MAPK, l'axe ERK1/2-NRF2/BACH1, l'axe PI3K/AKT et l'inactivation de CREB.

Retour au texte

Figure 15 : Mécanismes supposés de la neurotoxicité induite par une exposition précoce aux agents anesthésiques et les potentiels conséquences sur le développement neurocognitif *(selon [174]).*



Retour au texte

F. IMPLICATION DE LA BALANCE EXCITATION / INHIBITION

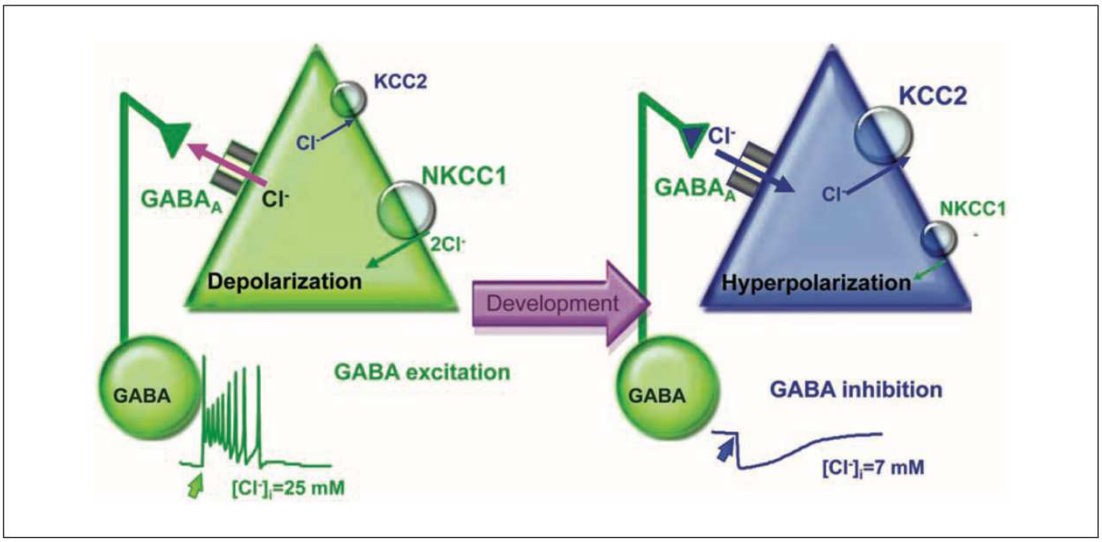
Comme nous l'avons vu en introduction (voir Chapitre I.B.2 - Mécanismes d'actions des AA), les anesthésiques généraux ont des effets puissants sur les neurotransmissions inhibitrices et excitatrices avec de nombreuses cibles potentielles [70]. Les neurones excitateurs et les neurones inhibiteurs forment des réseaux neuronaux qui, grâce à la signalisation synaptique, maintiennent une activité finement équilibrée dans le réseau[175–177]. Cette activité électrique apparait comme un régulateur central de la survie neuronale et de la connectivité synaptique qui s'établit au cours du développement [91,98–102] (voir Chapitre I.C.2 – Balance excitation / inhibition). Le glutamate et le GABA sont les 2 principaux neurotransmetteurs qui déterminent l'excitabilité neuronale. Leur rôle dans la régulation des mécanismes de survie neuronale, notamment dans le cadre de la synaptogénèse et de la mort cellulaire programmée associée, apparait particulièrement complexe. Plusieurs hypothèses rapportent des interactions étroites et réciproques entres les systèmes glutamatergique et GABAergique nécessaires à l'établissement d'un équilibre E/I approprié au bon développement cérébral.

Le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur (afflux d'ions chlorure hyperpolarisant le neurone) qui contrebalance l'excitation dans le cerveau mature. En revanche au début du développement, la signalisation GABA induirait des courants chlorures sortants et donc dépolarisants [178]. Les signaux GABAergiques dépolarisants augmentent le calcium intracellulaire, source majeure de stimulation excitatrice. Le rôle de la dépolarisation induite par le GABA au cours du développement précoce a été impliquée dans la

plupart des processus de prolifération, maturation et migration neuronales ainsi que dans la formation et la maturation des synapses. L'hypothèse d'un « switch » GABAergique (excitateur dans le cerveau immature puis inhibiteur dans le cerveau mature) au cours du développement postnatal précoce est supporté par un grand nombre de travaux [179,180]. Le mécanisme moléculaire qui déclenche ce switch GABAergique postnatal reste controversé mais pourrait impliquer les cotransporteurs Sodium Potassium Chlore de type 1 et Potassium Chlore de type 2 (NKCC1 et KCC2 respectivement). Le cotransporteur NKCC1 est connu pour son rôle dans le maintien d'une concentration intracellulaire élevée de chlore dans les neurones immatures [181]. Le passage ontogénétique à une action hyperpolarisante du GABA serait causé par une diminution de l'intégration membranaire de NKCC1 et une augmentation concomitante de KCC2. L'expression de KCC2 n'est en effet pas détectable dans les neurones de rat à la naissance, et son expression au cours de la deuxième semaine postnatale est associée à un changement progressif des réponses médiées par les R-$GABA_A$ (Figure 16) [182]. Ainsi, la modification du rapport NKCC1/KCC2, à l'origine d'une diminution de la concentration intracellulaire de chlorure, entrainerait le passage à des réponses GABAergiques hyperpolarisantes [182–185]. Par ailleurs, au cours de la synaptogénèse, la dépolarisation GABAergique apparait suffisante pour lever le blocage voltage dépendant des R-NMDA par le magnésium. Cette activation du R-NMDA permettrait aux synapses immatures et silencieuses de devenir fonctionnelles via l'intégration de récepteurs glutamatergiques non NMDA (tels que les récepteurs glutamatergiques AMPA–acide alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionique) [175].

Figure 16 : Switch de l'action du GABA au cours du développement

(selon [182])



Le switch GABA serait déterminé en partie par le développement séquentiel des deux principaux cotransporteurs de chlorure, NKCC1 et KCC2. Le premier est déjà présent in utero et importe le chlore. Le second non exprimé à la naissance exporte le chlore. Dans les neurones plus adultes, KCC2 fonctionne pleinement, tandis que NKCC1 est moins actif.

Retour au texte

Parallèlement, il existe de nombreuses données ayant montré que l'activité neuronale en général, et l'activité des R-NMDA en particulier, pouvaient réguler la survie et la maturation des neurones et synapses GABAergiques ([99,100,177], revue [186]). Il est intéressant de noter que, dans les neurones en développement, les R-NMDA sont fortement colocalisés avec les R-$GABA_A$ au niveau des synapses GABAergiques, ce qui pourrait apporter un argument

neuroanatomique à la régulation du développement des synapses GABAergiques par les R-NMDA [187]. Ainsi, au cours du neurodéveloppement précoce, l'impulsion dépolarisante fournie par l'activité des R-$GABA_A$ faciliterait l'activation des R-NMDA qui, à leur tour, régulerait le développement des synapses GABAergiques afin d'établir un équilibre E/I optimal au bon fonctionnement du cerveau [188].

Les R-NMDA sont des hétérotétramères constitués de deux sous-unités GluN1 et de deux sous-unités GluN2 et/ou GluN3. Les rôles physiologiques et les propriétés pharmacologiques du R-NMDA apparaissent, entre autres, déterminés par la composition de ses sous-unités, en particulier le type de sous-unité GluN2 incorporée. La sous unité GluN2A, et dans une moindre mesure la sous unité GluN2B, sont les plus répandues au niveau du cerveau mature. L'activation des R-NMDA - GluN2A favoriserait la survie des neurones, tandis que l'activation des R-NMADA - GluN2B serait associée aux voies de signalisation pro-apoptotiques [189,190]. La composition des sous-unités des R-NMDA est évolutive au cours du développement et serait pilotée par l'activité neuronale. Dans le cerveau embryonnaire, seules les sous-unités GluN2B et GluN2D sont exprimées. Des changements majeurs dans les schémas d'expression des sous-unités GluN2 vont se produire au cours des deux premières semaines postnatales chez le rongeur : la sous-unité GluN2B, prédominante au cours des deux premières semaines postnatales, va ensuite diminuer jusqu'à atteindre des niveaux modérés à l'âge adulte. À l'inverse, l'expression de GluN2A commence peu après la naissance et augmente régulièrement pour devenir abondamment exprimée dans pratiquement toutes les zones du SNC de l'adulte. Ainsi au cours du développement postnatal précoce, les R-NMDA changent la composition de leurs sous-unités, passant

d'une prédominance de sous-unités GluN2B à celle de sous-unités GluN2A [73]. Les mécanismes moléculaires qui entraînent le « switch » des sous-unité GluN2 au cours du développement restent incertains. Il est cependant bien établi que l'expression totale de GluN2A augmente considérablement au cours de la période critique de synaptogénèse rapide et que ce « switch » est dépendant de l'activité neuronale.

Ainsi, les effets potentiellement neurotoxiques induit par l'anesthésie pourraient être, tout du moins en partie, en lien avec leurs effets sur les neurotransmissions inhibitrices et excitatrice synaptique entrainant un déséquilibre de la balance E/I au cours de la période critique de synaptogénèse rapide. Plusieurs travaux ont étudié l'effet du sévoflurane sur les transmissions GABAergiques et glutamatergiques. Edwards et al. ont exposés au sévoflurane (2,1% pendant 6h) des rats en période néonatale (P4). Comme attendu, l'activité des caspases 3 était augmentée de façon significative. En revanche, les animaux ayant reçu du bumétanide, un inhibiteur spécifique de NKCC1, avant l'exposition au sévoflurane présentaient des signaux d'activation de la c-caspase-3 comparables à ceux des rats témoins [191]. Cabrera et al. ont également cherché à mettre en évidence l'effet de l'exposition au sévoflurane sur la régulation des co-transporteurs NKCC1 et KCC2 : chez le rat P7, après 6 heures d'exposition au sévoflurane (3% pendant 2h puis 2.4% pendant 4h), une augmentation de l'expression corticale de NKCC1 de plus de deux fois par rapport aux témoins était retrouvée. L'expression de KCC2 était également augmentée mais sans atteindre le seuil de significativité statistique. Vingt-quatre heures après l'exposition, les animaux du groupe sévoflurane présentaient une réduction significative de la protéine KCC2 sans différence sur celle de NKCC1. Ainsi, le ratio NKCC1/KCC2 cortical était augmenté à la

fois à 6h par augmentation de l'expression de NKCC1 mais également à 24h (4,5 fois plus élevé que dans le groupe contrôle) essentiellement par une diminution marquée de l'expression de KCC2. Cet effet retardé à H24 de l'exposition au sévoflurane favoriserait alors une hyperexcitabilité neuronale [184]. Ces données suggèrent que l'effet neurotoxique induit par le sévoflurane dans le cerveau en développement, pourrait être associé, plus ou moins durablement, à la potentialisation des courants chlore dépolarisants médiés par les R-$GABA_A$ dans le cerveau immature. Parallèlement, l'anesthésie au sévoflurane à un stade précoce de la vie pourrait affecter la composition des sous-unités des R-NMDA chez le rat. Il a été démontré que l'exposition au sévoflurane à la fois in vitro (culture de neurone) et in vivo (raton P7 exposé à 3% de sévoflurane pendant 6h) diminuait l'expression de la sous-unité GluN2A, et augmentait celle de GluN2B 6 h après la fin de l'exposition. Par ailleurs, in vivo, la stimulation des R-NMDA - GluN2A et l'inhibition des R-NMDA - GluN2B amélioraient la neurotoxicité développementale induite par le sévoflurane [167]. Dans le travail de Zhang et al. les ratons ont été exposés à 2,1 % de sévoflurane pendant 2 heures, lors de 3 jours consécutif, de P6 à P8. L'exposition au sévoflurane était associé à une augmentation de l'expression de GluN1 et GluN2B au niveau du cortex préfrontal immédiatement à la fin du traitement de 3 jours. Deux semaines après la fin de l'exposition, à P21, les niveaux de protéines GluN1 et GluN2B restaient augmentés par rapport au groupe contrôle, tandis que ceux de GluN2A étaient diminués. Ces résultats suggèrent un effet durable de l'exposition postnatale au sévoflurane sur la composition des sous-unités des R-NMDA. Les animaux ont par ailleurs été soumis à des tests comportementaux. L'exposition précoce au sévoflurane était associée à une anxiété significative (hyper activité motrice au test du

champ ouvert à P21, P28 et P35) ainsi qu'à une altération de l'attention et de la mémoire de travail (test du labyrinthe à bras radial à P28) [192].

La neurotoxicité induite par l'anesthésie pourrait ainsi impliquer une dérégulation de l'équilibre de la balance E/I et donc de l'excitabilité neuronale avec de possibles conséquences à court et long termes. Un nombre important et croissant d'études pré-cliniques et cliniques ont montré que la régulation à la hausse de NKCC1 et/ou la régulation à la baisse de KCC2 pourrait être impliquées dans l'étiologie de pathologies neurologiques, notamment l'épilepsie et certains troubles du développement cognitivo-comportemental (schizophrénie, TSA …) [193–195]. Par ailleurs, l'importance du rôle physiologique des sous-unités des R-NMDA (GluN2A et GluN2B) chez l'homme peut être illustrée par les phénotypes des patients qui présentent des mutations dans les gènes qui les codent (GRIN2A et GRIN2B), notamment la déficience intellectuelle, les TSA, l'épilepsie ou encore la schizophrénie [196,197].

G. CONSÉQUENCES POTENTIELLES À LONG TERME

Nous venons de voir au travers ce manuscrit que l'exposition au sévoflurane en période néonatale était non seulement associée à des lésions structurelles aiguës, notamment une neuro-apoptose corticale accrue, mais était également susceptible d'altérer de façon durable la balance E/I. La perturbation de l'équilibre et de la dynamique de l'activité neuronales au niveau des récepteurs membranaires, des synapses et des circuits cérébraux pourrait interférer avec les processus physiologiques normaux du développement cérébral. Divers degrés de déséquilibre de la balance E/I sont néanmoins envisageables : les plus petits changements de cet équilibre pourraient être associés à des troubles « mineurs » du comportement ou de certaines fonctions cognitives (attention, mémoire, fonctions exécutives, langage) ; tandis que les plus sévères entraîneraient des déficits neurocognitifs profonds non classiquement associés aux possibles conséquences de l'exposition à l'AG [140]. Une littérature abondante suggère en effet que la perturbation de la balance E/I est un facteur important dans l'étiologie de nombreuses pathologies [182,198] neurodéveloppementales (Syndrome de Rett [199], Syndrome du X fragile [200]…), neurodégénératives (maladie d'Alzheimer, démence fronto-temporale, sclérose latérale amyotrophique [201]) ou encore psychiatriques (schizophrénie [202]). Un déséquilibre de cette balance E/I a également été associé à certains troubles cognitivo-comportementaux tels que les TSA [203] ou les TDAH [204].

Dans les travaux pionniers de Jevtovic-Todorovic et al., l'apoptose induite par l'exposition précoce à l'AG était associée à une altération à long terme de la transmission synaptique et des troubles de l'apprentissage persistants chez les rats adolescents exposés à l'anesthésie à P7 [30]. Cette

association entre neuro apoptose et trouble du développement cognitif a été par la suite rapportés par de nombreux autres travaux sur différentes modèles murins mais également chez les primates [28,30,110–113,135], et pour la plupart des AA utilisés en pratique clinique [114,116,159,174]. Les plus récentes revues de la littérature cliniques suggèrent également, malgré les nombreux biais existants, une association entre l'exposition à l'anesthésie au cours de la petite enfance et certains troubles neurodéveloppementaux : les plus fréquemment rapportés sont les troubles comportementaux et socio-émotionnels tels que les troubles des domaines d'intériorisation et d'extériorisation, les TDAH, les TSA et les troubles des fonctions exécutives (langage, vitesse de traitement, coordination motrice), et cela notamment en cas d'expositions multiples [32,37,39–45,141] (voir Chapitre 1.A.4 et Chapitre 1.C.3 Neurotoxicité et AA - données cliniques et expérimentales).

Bien que l'apoptose fasse partie intégrante du développement normal des mammifères, la question de la nature pathologique et des conséquences potentielles à long terme d'une perte cellulaire accrue induite par l'exposition à l'AG au cours des stades de développement précoces reste entière [43]. Il est capital de rappeler ici, que jusqu'à présent, il n'existe aucun lien de causalité défini entre l'apoptose neuronale et la probabilité de survenue de trouble neuro-cognitivo-comportementaux. Cependant, la neuro apoptose, au-delà de la perte cellulaire associée, pourrait entrainer une atteinte directe des neurones et des autres types de cellules cérébrales ayant survécus et altérer leurs maturation et plasticité, à l'origine de dommages à la fois structurels et fonctionnels. Des modifications durables de l'expression des gènes qui régulent les réponses développementales précoces aux neurotransmetteurs ont en effet été rapportées suite à l'exposition à des AA [205]. C'est le cas notamment des

cotransporteurs cation-chlore NKCC1 et KCC2 [184] ainsi que des sous-unités des R-NMDA [167,192] dont nous avons largement parlé plus tôt. Un nombre croissant de travaux récents suggère par ailleurs que l'exposition aux AA, dont le sévoflurane, pourrait induire des modifications d'ordre épigénétiques (notamment la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones, la méthylation des ARN) entrainant des profils d'expression protéique et de signalisation moléculaire anormaux [206–210]. Ces modifications épigénétiques supposées induites par le sévoflurane ont impliqué des facteurs de transcription clés, comme par exemple, la protéine de liaison à élément de réponse à l'AMPc (protéine CREB), conduisant à la régulation à la baisse des gènes cibles (facteur neurotrophique dérivé du cerveau, c-Fos) [211] ou encore la modulation de l'expression de KCC2 via la modification de la méthylation de l'ADN [212].

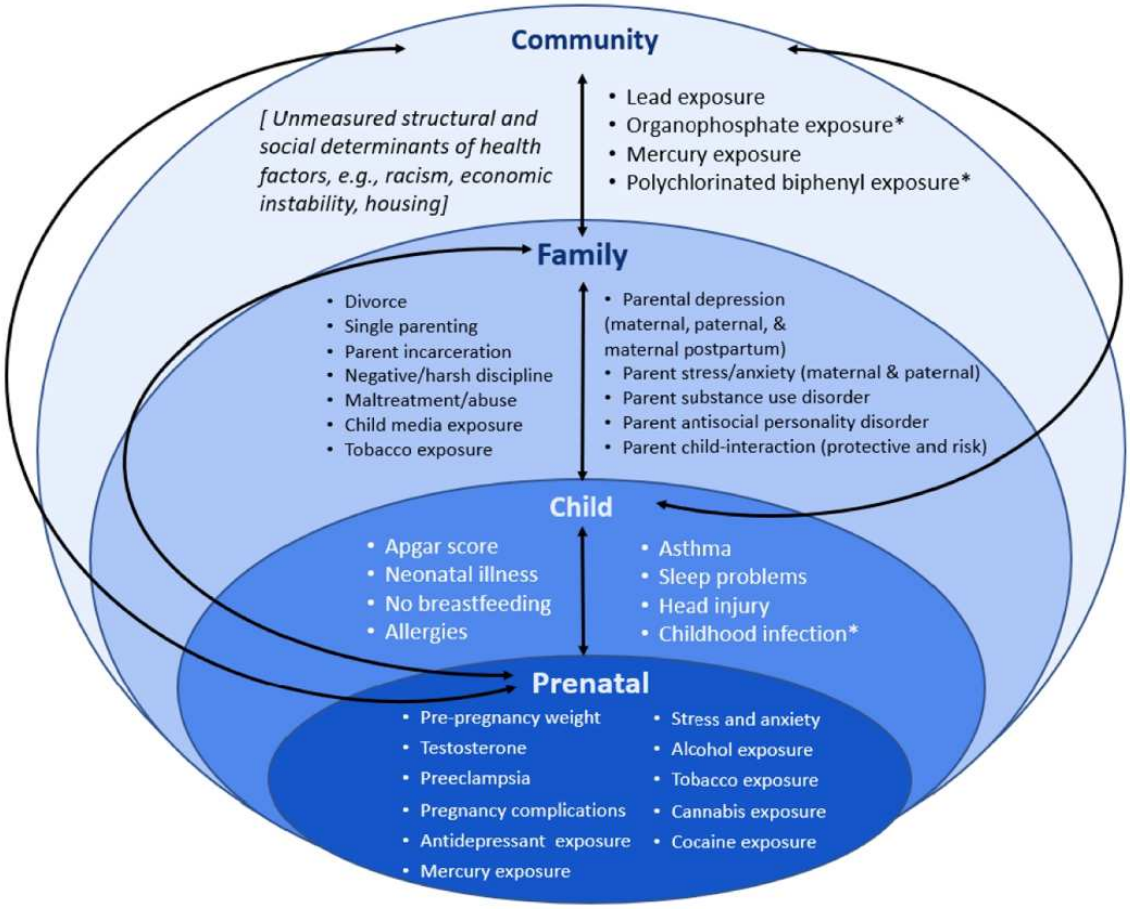
L'épigénétique apparait aujourd'hui comme une voie de recherche ubiquitaire et prometteuse dans le domaine de la santé. Le rôle de l'épigénétique est largement étudié en cancérologique [213], dans le développement et la progression des maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, sclérose latérale amyotrophique) [214] , neurodéveloppementales (TDAH [215], TSA, schizophrénie, épilepsie [216]) ou encore des pathologies métaboliques (obésité ou diabète de type 2) [217]. L'exposition à des drogues, médicaments ou produits environnementaux toxiques (pesticides, métaux lourds …), mais également les facteurs psychosociaux et affectifs, ou encore les habitudes nutritionnelles, sont autant de facteurs ayant été impliqués dans la survenue de modifications épigénétiques.

VI PERSPECTIVES ET CONCLUSION

Les protocoles et techniques d'anesthésie modernes sont considérés comme hautement sûres et s'avèrent très largement bénéfiques dans de nombreux contextes pathologiques. Cependant, au cours des dernières décennies, la neurotoxicité induite par l'exposition aux AA de cerveaux en développement a été soutenue par plusieurs centaines d'études pré-cliniques menées sur de nombreuses espèces animales et avec la majorité des AA utilisés en routine. Les résultats des études cliniques ne concordent toutefois pas avec les données expérimentales existantes. En effet, la pertinence translationnelle des modèles animaux actuellement disponibles reste limitée ; de plus, la question de l'implication des autres facteurs péri opératoires sur le développement du SNC, en dehors des effets spécifiques induits par les AA sur les circuits neuronaux, a très peu été explorée. Parallèlement les données cliniques des plus récentes revues de la littérature suggèrent que l'exposition multiple aux AA dans la petite enfance pourrait être associée à des troubles durables de certaines fonctions cognitivo-comportementales. La multitude de facteurs de confusion (co-morbidité, facteur péri opératoire incluant l'hospitalisation, le stress et l'inflammation associés à la chirurgie pour ne citer que quelques exemples) nécessite d'interpréter ces résultats avec précaution, alors même qu'une multitude d'autres facteurs périnataux sont susceptibles d'impacter le cours normal du développement cérébral. A titre d'exemple, la figure 17 illustre les facteurs de risque périnataux qui ont été associés au diagnostic de TDAH.

Bien que l'association rapportée par les données cliniques entre exposition à l'AG et troubles cognitivo-comportementaux soit faible, il parait peu concevable de l'ignorer totalement. Par ailleurs, bien qu'aucun lien de causalité n'ait été établi entre l'exposition à l'AG et sa neurotoxicité potentielle, les recherches visant à comprendre si et dans quelle mesure l'exposition à l'AG au début de la vie pourrait impacter le développement du cerveau restent essentielles pour tenter de répondre à ces incertitudes. Cela constitue également une opportunité majeure pour mieux comprendre les mécanismes d'action des AA, depuis leurs effets aigus et réversibles sur la mémoire et la conscience à leurs potentiels effets à long terme sur le fonctionnement du réseau neuronal.

Figure 17 : Exemple des facteurs de risque significatifs de diagnostic de trouble déficitaire de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH) chez l'enfant au cours du développement précoce. Issue de l'analyse de 6 méta-analyses [218]



** Certains facteurs de risque n'étaient significatifs que dans les analyses combinées ou globales comprenant à la fois des mesures pré et postnatales*

Retour au texte

Le travail actuel présente une quantification exhaustive et sans biais de choix anatomiques de la neuro-apoptose induite par le sévoflurane sur le cerveau en développement. Cette cartographie du cerveau entier constitue une étape précieuse avant d'envisager des explorations plus détaillées :

1/ le développement du cerveau humain semble influencé par l'exposition à des expériences positives et négatives vécues au début de la vie, qui sont susceptibles d'avoir des conséquences durables sur le développement cognitif et socio-affectif. Le moment de l'exposition à un facteur de stress apparait crucial, avec des périodes dites de vulnérabilité, spécifiques de régions et circuits cérébraux distincts. L'identification de régions de vulnérabilité en fonction de l'âge d'exposition et des différents AA utilisés seuls ou en co-administration représenterait une étape supplémentaire ;

2/ l'identification des voies de signalisation impliquées, depuis les récepteurs membranaires jusqu'à l'activation de la cascade des caspases apparait également particulièrement intéressante. La voie des kinases essentielles, telle que ERK 1/2 par exemple, est largement impliquée dans la survie neuronale, l'apprentissage et la formation de la mémoire ainsi que dans la régulation de la plasticité synaptique. Sa dérégulation pendant les périodes critiques du développement cérébrale serait un élément de la neuropathologie de plusieurs troubles du développement neurologique [219,220]. Son implication dans le neurotoxicité induite par le sévoflurane a notamment été soulignée par les nombreux travaux de Wang et al. [164–167] . Parmi les voies de signalisation largement impliquée dans la plupart des processus physiologique, la voie de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et de la protéine kinase A (PKA), a également été récemment mise en cause dans l'apoptose et les troubles cognitifs associés à l'exposition précoce au sévoflurane [221,222]. L'implication de

ces voies de signalisation reste sujette à un certain nombre de questions : comment le sévoflurane les module-t-il au niveau moléculaire, comment cette modulation par le sévoflurane interagit-elle avec d'autres voies de signalisation intracellulaire, si cette modulation est influencée par le dosage et la durée d'exposition au sévoflurane ou encore si la restauration de ces voies de signalisation pourrait permettre de renverser les effets neurotoxiques supposés du sévoflurane ;

3 / l'identification de stratégies préventives/neuroprotectrices permettant de réduire l'impact des conséquences potentielles de l'exposition précoce aux AA est un axe de recherche essentiel [223]. Parmi les stratégies qui ont, chez l'animal, rapportées une diminution de la neuro apoptoses et/ou des troubles comportementaux associés à l'exposition précoce au sévoflurane, on peut citer les stratégies visant à la protection mitochondriale (diminution du stress oxydatif et de la neuro-inflammation par la curcumine [224]), la restauration de la voie de signalisation anti apoptotique des kinases ERK 1/2 par la N-stearoyl-l-tyrosine, un analogue de l'anandamide - cannabinoïde endogène [166], ou de la voie de signalisation dépendante de la PKA par le bucladesine, un agoniste sélectif de la PKA [222], l'activation des voies neurotrophiques (érythropoïétine [225], resveratrol [226]) ou encore les stratégies visant à la restauration de l'équilibre E/I (bumétanide - un inhibiteur de NKCC1 de la voie GABAergique [191,227], mémantine – un inhibiteur des R-NMDA [167]). Au-delà de ces stratégies neuroprotectrices, à ce jour principalement limitées au domaine expérimental, il existe peu d'alternative aux AA utilisés en pratique quotidienne. Les seuls autres médicaments utilisés en clinique pour la sédation et l'anesthésie qui ne semblent pas provoquer de neurodégénérescence chez l'animal sont les alpha-2-agonistes et les opioïdes, qui contrairement à la plupart des autres AA

n'agissent pas prioritairement ni directement sur les voies de signalisation GABAergiques et/ou glutamatergiques. La dexmédétomidine, un agoniste hautement sélectif des récepteurs adrénergiques α2, ainsi que des récepteurs de l'imidazoline, est utilisé en clinique pour ses propriétés sédatives, anxiolytiques et co-analgésiques. Un nombre croissant d'études tende à montrer que la dexmédétomidine pourrait avoir un effet neuroprotecteur dans divers modèles d'agressions cérébrales [228–232] ainsi que dans la prévention des troubles cognitivo-comportementaux post-opératoires [233,234]. Plusieurs travaux ont examiné spécifiquement l'effet neuroprotecteur de la dexmédétomidine sur la neurotoxicité induite par le sévoflurane sur le cerveau en développement : Zhang et al. [235] ont exposée des souris P6 à 6h de sévoflurane 3% associé ou non avec une injection intrapéritonéale de dexmédétomidine et/ou de yohimbine, un antagoniste des récepteurs adrénergiques α2. Comparativement au groupe sévoflurane, les auteurs rapportent une atténuation de l'apoptose neuronale, de la libération de cytokines pro-inflammatoires, du stress oxydatif et des troubles de l'apprentissage et de la mémoire dans le groupe dexmédétomidine. Tous ces effets étaient inversés par la yohimbine, suggérant l'implication, au moins en partie, de la voie médiée par les récepteurs adrénergiques α2. Li et al. [219] ont rapporté, chez le rat P7 exposé au sévoflurane, une augmentation du taux de GluN2B, une baisse du niveau de phosphorylation d'ERK associés à des troubles comportementaux. Tous ces effets étaient inversés par la co-administration de dexmédétomidine suggérant un effet lié à la modulation de la voie de signalisation ERK induite par le R-NMDA. Ainsi, les effets neuroprotecteurs de la dexmédétomidine pourraient impliquer de nombreux mécanismes d'action dont, entre autres, la réduction du stress oxydatif, de la production de cytokines pro-inflammatoires, la modulation

de voies pro/anti apoptotiques ou encore la modulation de la libération des neurotransmetteurs impliqués dans l'excitabilité neuronale et l'équilibre E/I [228,236].

Ainsi, dans une perspective à court terme, nous souhaitons exploiter nos résultats sur l'apoptose induite par le sévoflurane en étudiant d'autres AA utilisés seuls ou en association. A titre d'exemple, la cartographie et la quantification du marquage c-caspase-3, *in-vivo*, sur cerveaux entiers de souris P7 (méthodologie i-DISCO+ précédemment décrite), après exposition à différentes concentrations de sévoflurane, et associée ou non à l'administration intrapéritonéale de dexmédétomidine permettrait de caractériser l'effet de la dexmédétomidine (neuroprotection ?) sur l'apoptose induite par le sévoflurane. Les premières expériences i-DISCO+ que nous avons réalisées avec l'association sévoflurane et dexmédétomidine (annexe 2) ont malheureusement rencontré différents problèmes techniques (échecs de transparisation et mauvaise réhydratation des cerveaux, dysfonctionnements du microscope à feuille de lumière lors des acquisitions) rendant les résultats difficilement interprétables à ce jour.

Parallèlement, nous cherchons à explorer les mécanismes potentiellement impliqués au niveaux cellulaire et moléculaire. Comme nous l'avons vu plus haut, les modulations de la balance E/I et des voies de signalisation pro- et anti-apoptotiques pourraient être impliquées dans la neurotoxicité des AA tout comme dans l'effet neuroprotecteur de la dexmédétomidine. Nous avons ainsi initié des travaux basés sur l'imagerie de biosenseurs. Cette technologie permet l'analyse spatio-temporelle de processus biochimiques intracellulaires.

Il existe des biosenseurs pour détecter des ions tel que le calcium, des seconds messagers tel que l'AMPc ou encore des réactions enzymatiques comme l'activité des kinases. *In-vitro*, nous nous sommes basés sur un modèle de culture primaire de neurone post-natal d'hippocampe génétiquement manipulée afin d'exprimer deux biosenseurs différents [237]. Un indicateur calcique (GCaMP6) d'une part et un rapporteur ERK basé sur le principe de transfert d'énergie bioluminescente par résonance (BRET) d'autre part. Ces deux biosenseurs pourraient nous permettre de caractériser respectivement les effets de différents AA sur la dynamique calcique (témoin de l'activité neuronale) et sur l'activité ERK (annexe 3). Les premières expériences réalisées *in-vitro* avaient pour objectif de vérifier la comptabilité de l'imagerie calcique et du BRET dans l'optique d'une imagerie séquentielle. Elles se sont avérées non concluantes du fait de l'absence de signal calcique analysable. Par la suite, nous avons donc cherché à valider le model d'imagerie des biosenseurs calcique d'une part et ERK d'autre part, en conditions basales et après exposition à la dexmédétomidine : en condition basale, nos résultats se sont avérés peu reproductibles, notamment en imagerie calcique, imposant une nouvelle étape d'optimisation de nos protocoles d'acquisition. Après exposition à la dexmédétomidine, nous avons pu observer une augmentation de l'activité ERK, résultats préliminaires qui doivent être confirmés sur un échantillon plus large.

Toujours dans une perspective à court terme, nous nous intéressons à la voie de signalisation AMPc/PKA. Nous avons initié des travaux sur un modèle de tranches de cerveaux de souriceaux infectées *ex-vivo* avec un vecteur viral permettant d'exprimer le biosenseur Epac-S^{H150}. Ce biosenseur, basé sur le principe de transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET), permet

de mesurer les variations des niveaux d'AMPc après exposition des tranches de cerveaux à différents agents, ici les AA halogénés et la dexmédétomidine. (annexe 4). Les premières expériences réalisées sur tranches de cerveaux nous ont permis de valider la faisabilité du tranport de gaz halogénés jusqu'au poste d'imagerie grâce à un mélange de 5% d'isoflurane et de carbogène mis en bullage. Nos premières observations ont également rapporté une variation des niveaux intra-cellulaire d'AMPc au niveau du cortex après exposition à l'isoflurane. Ces résultats nous incitent à poursuivre l'exploration des effets potentiels des AA, notamment halogénés, sur les cyclases.

Nos travaux ont mis en lumière les défis et les opportunités associés à l'étude de l'apoptose induite par le sévoflurane à travers l'utilisation d'une approche innovante d'imagerie tridimensionnelle d'échantillons transparisés. L'application d'autres techniques d'imagerie avancées telles que l'imagerie de biosenseurs offre un potentiel notable pour une analyse spatio-temporelle précise et l'amélioration de notre compréhension des processus biochimiques intracellulaires impliquées. L'identification et la caractérisation de nouveaux agents neuroprotecteurs constituent, par ailleurs, un objectif important. La dexmédétomidine, médicament disponible dans la pharmacopée actuelle et avec des effets secondaires limités et bien connus, se présente comme une candidate prometteuse. Une compréhension approfondie des mécanismes d'action de la dexmédétomidine, ainsi que son effet potentiel sur la neurotoxicité des agents anesthésiques, pourrait ouvrir de nouvelles perspectives pour le développement de stratégies thérapeutiques plus sûres et avoir un impact significatif direct sur la pratique clinique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Rabbitts, J. A. & Groenewald, C. B. Epidemiology of Pediatric Surgery in the United States. *Paediatr Anaesth* **30**, 1083–1090 (2020).
2. Shi, Y. *et al.* Epidemiology of general anesthesia prior to age 3 in a population-based birth cohort. *Paediatr Anaesth* **28**, 513–519 (2018).
3. Dadure, C., Marie, A., Seguret, F. & Capdevila, X. One year of anaesthesia in France: A comprehensive survey based on the national medical information (PMSI) database. Part 1: In-hospital patients. *Anaesth Crit Care Pain Med* **34**, 191–197 (2015).
4. Macq, C. *et al.* Epidemiologic picture of one-year-pediatric anesthesia in France. *Ann Fr Anesth Reanim* **31**, 835–839 (2012).
5. Bartels, D. D. *et al.* Estimating pediatric general anesthesia exposure: Quantifying duration and risk. *Paediatr Anaesth* **28**, 520–527 (2018).
6. Amalberti, R., Auroy, Y., Berwick, D. & Barach, P. Five system barriers to achieving ultrasafe health care. *Ann Intern Med* **142**, 756–764 (2005).
7. de Graaff, J. C., Johansen, M. F., Hensgens, M. & Engelhardt, T. Best practice & research clinical anesthesiology: Safety and quality in perioperative anesthesia care. Update on safety in pediatric anesthesia. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* **35**, 27–39 (2021).
8. Talabi, A. O. *et al.* A 10-year retrospective review of perioperative mortality in pediatric general surgery at Ile-Ife Hospital, Nigeria. *J Pediatr Surg* **53**, 2072–2076 (2018).
9. Meyer, H. M., Thomas, J., Wilson, G. S. & de Kock, M. Anesthesia-related and perioperative mortality: An audit of 8493 cases at a tertiary pediatric teaching hospital in South Africa. *Paediatr Anaesth* **27**, 1021–1027 (2017).
10. Cronjé, L. A review of paediatric anaesthetic-related mortality, serious adverse events and critical incidents. *Southern African Journal of Anaesthesia and Analgesia* **21**, 5–11 (2015).
11. Torborg, A. *et al.* Outcomes after surgery for children in Africa (ASOS-Paeds): a 14-day prospective observational cohort study. *The Lancet* **403**, 1482–1492 (2024).
12. Azevedo, F. A. C. *et al.* Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol* **513**, 532–541 (2009).
13. Gilmore, J. H., Knickmeyer, R. C. & Gao, W. Imaging structural and functional brain development in early childhood. *Nat Rev Neurosci* **19**, 123–137 (2018).
14. Habre, W. *et al.* Incidence of severe critical events in paediatric anaesthesia (APRICOT): a prospective multicentre observational study in 261 hospitals in Europe. *Lancet Respir Med* **5**, 412–425 (2017).
15. Trachsel, D., Svendsen, J., Erb, T. O. & Von Ungern-Sternberg, B. S. Effects of anaesthesia on paediatric lung function. *Br J Anaesth* **117**, 151–163 (2016).

16. Murat, I., Constant, I. & Maud'Huy, H. Perioperative anaesthetic morbidity in children: a database of 24,165 anaesthetics over a 30-month period. *Paediatr Anaesth* **14**, 158–166 (2004).

17. Von Ungern-Sternberg, B. S. *et al.* Risk assessment for respiratory complications in paediatric anaesthesia: a prospective cohort study. *The Lancet* **376**, 773–783 (2010).

18. Hohn, A. *et al.* Incidence of peri-operative paediatric cardiac arrest and the influence of a specialised paediatric anaesthesia team: Retrospective cohort study. *Eur J Anaesthesiol* **36**, 55–63 (2019).

19. Auroy, Y., Ecoffey, C., Messiah, A. & Rouvier, B. Relationship between complications of pediatric anesthesia and volume of pediatric anesthetics. *Anesth Analg* **84**, 234–235 (1997).

20. ADARPEF - SFAR. RECOMMANDATIONS POUR LA PRATIQUE PROFESSIONNELLE. *https://sfar.org/download/organisation-de-lanesthesie-pediatrique/?wpdmdl=43179&refresh=647dc2352d6d11685963317* (2023).

21. Ministère de la santé et de la protection sociale. Circulaire N°517/DHOS/O1/DGS/DGAS du 28 octobre 2004 relative à l'élaboration des SROS de l'enfant et de l'adolescent. *Bulletin Officiel n°2004-52* https://sante.gouv.fr/fichiers/bo/2004/04-52/a0523394.htm (2004).

22. Courrèges, P. *et al.* Maintien des compétences en anesthésie pédiatrique. *Ann Fr Anesth Reanim* **25**, 353–355 (2006).

23. Bainbridge, D., Martin, J., Arango, M. & Cheng, D. Perioperative and anaesthetic-related mortality in developed and developing countries: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* **380**, 1075–1081 (2012).

24. US Food and Drug Administration. Drug Safety and Availability—FDA Drug Safety Communication: FDA Review Results in New Warnings about Using General Anesthetics and Sedation Drugs in Young Children and Pregnant Women. (2016).

25. US Food and Drug Administration. FDA Drug Safety Communication: FDA Approves Label Changes for Use of General Anesthetic and Sedation Drugs in Young Children. (2017).

26. Istaphanous, G. K., Ward, C. G. & Loepke, A. W. The impact of the perioperative period on neurocognitive development, with a focus on pharmacological concerns. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* **24**, 433–449 (2010).

27. Yon, J. H., Daniel-Johnson, J., Carter, L. B. & Jevtovic-Todorovic, V. Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Neuroscience* **135**, (2005).

28. Zheng, S. Q., An, L. X., Cheng, X. & Wang, Y. J. Sevoflurane causes neuronal apoptosis and adaptability changes of neonatal rats. *Acta Anaesthesiol Scand* **57**, 1167–1174 (2013).

29. Cattano, D., Young, C., Straiko, M. M. W. & Olney, J. W. Subanesthetic doses of propofol induce neuroapoptosis in the infant mouse brain. *Anesth Analg* **106**, 1712–1714 (2008).

30. Jevtovic-Todorovic, V. *et al.* Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J. Neurosci.* **23**, 876–882 (2003).

31. Davidson, A. J. *et al.* Anesthesia and the developing brain: a way forward for clinical research. *Paediatr Anaesth* **25**, 447–452 (2015).

32. Walkden, G. J., Pickering, A. E. & Gill, H. Assessing Long-term Neurodevelopmental Outcome Following General Anesthesia in Early Childhood: Challenges and Opportunities. *Anesth Analg* **128**, 681–694 (2019).

33. Foubert, R., Devroe, S., Foubert, L., Van de Velde M. & Rex, S. Anesthetic neurotoxicity in the pediatric population : a systematic review of the clinical evidence. *Acta Anaesthesiol Belg* **71**, 51–65 (2020).

34. Sun, L. S. *et al.* Association Between a Single General Anesthesia Exposure Before Age 36 Months and Neurocognitive Outcomes in Later Childhood. *JAMA* **315**, 2312–2320 (2016).

35. Warner, D. O. *et al.* Neuropsychological and Behavioral Outcomes after Exposure of Young Children to Procedures Requiring General Anesthesia: The Mayo Anesthesia Safety in Kids (MASK) Study. *Anesthesiology* **129**, 89–105 (2018).

36. McCann, M. E. *et al.* Neurodevelopmental outcome at 5 years of age after general anaesthesia or awake-regional anaesthesia in infancy (GAS): an international, multicentre, randomised, controlled equivalence trial. *The Lancet* **393**, 664–677 (2019).

37. Ing, C. *et al.* Prospectively assessed neurodevelopmental outcomes in studies of anaesthetic neurotoxicity in children: a systematic review and meta-analysis. *Br J Anaesth* **126**, 433–444 (2021).

38. Bartels, D. D. *et al.* Estimating pediatric general anesthesia exposure: Quantifying duration and risk. *Paediatr Anaesth* **28**, 520–527 (2018).

39. Reighard, C. *et al.* Anesthetic Exposure During Childhood and Neurodevelopmental Outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open* **5**, E2217427 (2022).

40. Useinovic, N. & Jevtovic-Todorovic, V. Controversies in anesthesia-induced developmental neurotoxicity. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* **37**, 28–39 (2023).

41. Ing, C. & Vutskits, L. Unanswered questions of anesthesia neurotoxicity in the developing brain. *Curr Opin Anaesthesiol* **36**, 510–515 (2023).

42. Ing, C. & Bellinger, D. C. Long-term cognitive and behavioral outcomes following early exposure to general anesthetics. *Curr Opin Anaesthesiol* **35**, 442–447 (2022).

43. Jevtovic-Todorovic, V. & Useinovic, N. Early exposure to general anaesthesia and increasing trends in developmental behavioural impairments: is there a link? *Br J Anaesth* **131**, 208–211 (2023).

44. Xiao, A. *et al.* General anesthesia in children and long-term neurodevelopmental deficits: A systematic review. *Front Mol Neurosci* **15**, 972025 (2022).

45. Ing, C. *et al.* Anesthesia and Developing Brains: Unanswered Questions and Proposed Paths Forward. *Anesthesiology* **136**, 500–512 (2022).

46. Robinson, E. J., Lyne, T. C. & Blaise, B. J. Safety of general anaesthetics on the developing brain: are we there yet? *BJA open* **2**, (2022).

47. Snow, J. On chloroform and other anaesthetics; their action and administration. *Br J Anaesth* **30**, 288–297 (1958).

48. Mai, C. L. & Coté, C. J. A history of pediatric anesthesia: a tale of pioneers and equipment. *Pediatric Anesthesia* **22**, 511–520 (2012).

49. Shephard, D. A. E. History of Anaesthesia - John Snow and Research. *Canadian Journal of Anaesthesia* **36**, 224–241 (1989).

50. Gregory, G. A. Pediatric anesthesia. in *The Wondrous Story of Anesthesia* vol. 9781461484417 887–903 (Springer New York, 2014).

51. Donnino, M. W., Miller, J., Goyal, N., Loomba, M. & Sankey, S. S. Ombrédanne Inhaler 1908–1982(?). *Anesthesiology* **117**, 1164–1164 (2012).

52. Jones, R. A history of inhaled anesthetics. in *The Wondrous Story of Anesthesia* 609–627 (Springer New York, 2014). doi:10.1007/978-1-4614-8441-7_46/COVER.

53. Chau, P. L. New insights into the molecular mechanisms of general anaesthetics. *Br J Pharmacol* **161**, 288 (2010).

54. Eger, E. I., Saidman, L. J. & Westhorpe, R. N. *The Wondrous Story of Anesthesia*. *The Wondrous Story of Anesthesia* vol. ISBN 9781461484417 (Springer New York, 2014).

55. Kissin, I. Components of General Anesthesia: History of the Concept Transformation. *Anesth Analg* **137**, 702–707 (2023).

56. Hudson, A. E., Herold, K. F. & Hemmings, H. C. Pharmacology of Inhaled Anesthetics. *Pharmacology and Physiology for Anesthesia: Foundations and Clinical Application* 217–240 (2019) doi:10.1016/B978-0-323-48110-6.00011-9.

57. Zhang, M. *et al.* A new understanding of inert gas narcosis*. *Chinese Physics B* **25**, 013602 (2015).

58. Urban, B. W., Bleckwenn, M. & Barann, M. Interactions of anesthetics with their targets: Non-specific, specific or both? *Pharmacol Ther* **111**, 729–770 (2006).

59. Franks, N. P. & Lieb, W. R. Where do general anaesthetics act? *Nature 1978* **274**, 339–342 (1978).

60. Franks, N. P. & Lieb, W. R. Do general anaesthetics act by competitive binding to specific receptors? *Nature* **310**, 599–601 (1984).

61. Franks NP. Molecular targets underlying general anaesthesia. *Br J Pharmacol* **147**, S72–S81 (2006).

62. Mashour, G. A., Forman, S. A. & Campagna, J. A. Mechanisms of general anesthesia: from molecules to mind. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* **19**, 349–364 (2005).

63. Iqbal, F. *et al.* Anesthetics: From modes of action to unconsciousness and neurotoxicity. *J Neurophysiol* **122**, 760–787 (2019).

64. Baldassarre, D., Scarpati, G. & Piazza, O. Mechanisms of Action of Inhaled Volatile General Anesthetics: Unconsciousness at the Molecular Level. *Neuromethods* **150**, 109–123 (2020).

65. Rajagopal, S., Sangam, S. & Singh, S. Differential regulation of volatile anesthetics on ion channels. *Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis* **5**, 128–134 (2015).

66. Zhou, W. & Guan, Z. Ion Channels in Anesthesia. *Adv Exp Med Biol* **1349**, 401–413 (2021).

67. Dai, S., Perouansky, M. & Pearce, R. A. Isoflurane enhances both fast and slow synaptic inhibition in the hippocampus at amnestic concentrations. *Anesthesiology* **116**, 816–823 (2012).

68. Nishikawa, K. & Harrison, N. L. The actions of sevoflurane and desflurane on the gamma-aminobutyric acid receptor type A: effects of TM2 mutations in the alpha and beta subunits. *Anesthesiology* **99**, 678–684 (2003).

69. Woll, K. A. *et al.* Identification of binding sites contributing to volatile anesthetic effects on GABA type A receptors. *The FASEB Journal* **32**, 4172 (2018).

70. Campagna, J. A., Miller, K. W. & Forman, S. A. Mechanisms of Actions of Inhaled Anesthetics. *New England Journal of Medicine* **348**, 2110–2124 (2003).

71. Forman, S. A., Chiara, D. C. & Miller, K. W. Anesthetics target interfacial transmembrane sites in nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* **96**, 169–177 (2015).

72. Violet, J. M., Downie, D. L., Nakisa, R. C., Lieb, W. R. & Franks, N. P. Differential Sensitivities of Mammalian Neuronal and Muscle Nicotinic Acetylcholine Receptors to General Anesthetics. *Anesthesiology* **86**, 866–874 (1997).

73. Paoletti, P., Bellone, C. & Zhou, Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience 2013 14:6* **14**, 383–400 (2013).

74. Johnson, J. W. & Ascher, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* **325**, 529–531 (1987).

75. Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A. & Prochiantz, A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* **307**, 462–465 (1984).

76. Hollmann, M. W., Liu, H. T., Hoenemann, C. W., Liu, W. H. & Durieux, M. E. Modulation of NMDA receptor function by ketamine and magnesium. Part II: Interactions with volatile anesthetics. *Anesth Analg* **92**, 1182–1191 (2001).

77. Solt, K., Eger, E. I. & Raines, D. E. Differential modulation of human N-methyl-D-aspartate receptors by structurally diverse general anesthetics. *Anesth Analg* **102**, 1407–1411 (2006).

78. Petrenko, A. B., Yamakura, T., Sakimura, K. & Baba, H. Defining the role of NMDA receptors in anesthesia: Are we there yet? *Eur J Pharmacol* **723**, 29–37 (2014).

79. Platholi, J. & Hugh C. Hemmings, Jr. Effects of General Anesthetics on Synaptic Transmission and Plasticity. *Curr Neuropharmacol* **20**, 27 (2022).

80. Palanca, B. J. A., Avidan, M. S. & Mashour, G. A. Human neural correlates of sevoflurane-induced unconsciousness. *BJA: British Journal of Anaesthesia* **119**, 573–582 (2017).

81. Bao, W. W. *et al.* Understanding the Neural Mechanisms of General Anesthesia from Interaction with Sleep–Wake State: A Decade of Discovery. *Pharmacol Rev* **75**, 532–553 (2023).

82. Lyu, J., Cai, H., Chen, Y. & Chen, G. Brain areas modulation in consciousness during sevoflurane anesthesia. *Front Integr Neurosci* **16**, 1031613 (2022).

83. Hemmings, H. C. *et al.* Towards a Comprehensive Understanding of Anesthetic Mechanisms of Action: A Decade of Discovery. *Trends Pharmacol Sci* **40**, 464–481 (2019).

84. Luján, R., Shigemoto, R. & López-Bendito, G. Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience* **130**, 567–580 (2005).

85. Luhmann, H. J., Fukuda, A. & Kilb, W. Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. *Front Cell Neurosci* **9**, 122407 (2015).

86. Manent, J. B. & Represa, A. Neurotransmitters and Brain Maturation: Early Paracrine Actions of GABA and Glutamate Modulate Neuronal Migration. *Neuroscientist.* **13**, 268–279 (2007).

87. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation 2018 25:3* **25**, 486–541 (2018).

88. Dikranian, K. *et al.* Apoptosis in the in vivo mammalian forebrain. *Neurobiol Dis* **8**, 359–379 (2001).

89. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer 1972 26:4* **26**, 239–257 (1972).

90. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35**, 495–516 (2007).

91. Wong, F. K. & Marín, O. Developmental Cell Death in the Cerebral Cortex. *Annu Rev Cell Dev Biol* **35**, 523–542 (2019).

92. Dobbing, J. & Sands, J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* **3**, 79–83 (1979).

93. De La Rosa, E. J. & De Pablo, F. Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. *Trends Neurosci* **23**, 454–458 (2000).

94. Oppenheim, R. W. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* **14**, 453–501 (1991).

95. Blaschke, A. J., Staley, K. & Chun, J. Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. *Development* **122**, 1165–1174 (1996).

96. Thomaidou, D., Mione, M. C., Cavanagh, J. F. R. & Parnavelas, J. G. Apoptosis and Its Relation to the Cell Cycle in the Developing Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience* **17**, 1075–1085 (1997).

97. Pfisterer, U. & Khodosevich, K. Neuronal survival in the brain: neuron type-specific mechanisms. *Cell Death Dis* **8**, (2017).

98. Verney, C., Takahashi, T., Bhide, P. G., Nowakowski, R. S. & Caviness, V. S. Independent controls for neocortical neuron production and histogenetic cell death. *Dev Neurosci* **22**, 125–138 (2000).

99. Wong, F. K. *et al.* Pyramidal cell regulation of interneuron survival sculpts cortical networks. *Nature* **557**, 668–673 (2018).

100. De Lima, A. D., Opitz, T. & Voigt, T. Irreversible loss of a subpopulation of cortical interneurons in the absence of glutamatergic network activity. *European Journal of Neuroscience* **19**, 2931–2943 (2004).

101. Blanquie, O. *et al.* Electrical activity controls area-specific expression of neuronal apoptosis in the mouse developing cerebral cortex. *Elife* **6**, e27696 (2017).

102. Blanquie, O., Kilb, W., Sinning, A. & Luhmann, H. J. Homeostatic interplay between electrical activity and neuronal apoptosis in the developing neocortex. *Neuroscience* **358**, 190–200 (2017).

103. Bittigau, P. *et al.* Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15089–15094 (2002).

104. Turski, C. A. & Ikonomidou, C. Neuropathological sequelae of developmental exposure to antiepileptic and anesthetic drugs. *Front Neurol* **AUG**, 30275 (2012).

105. Ikonomidou, C. *et al.* Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem Pharmacol* **62**, 401–405 (2001).

106. Kaindl, A. M. *et al.* Brief Alteration of NMDA or GABAA Receptor-mediated Neurotransmission Has Long Term Effects on the Developing Cerebral Cortex. *Molecular & Cellular Proteomics* **7**, 2293–2310 (2008).

107. Gatto, C. L. & Broadie, K. Genetic controls balancing excitatory and inhibitory synaptogenesis in neurodevelopmental disorder models. *Front Synaptic Neurosci* **2**, 1553 (2010).

108. Ikonomidou, C. *et al.* Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science (1979)* **283**, 70–74 (1999).

109. Ikonomidou, C. *et al.* Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science (1979)* **287**, 1056–1060 (2000).

110. Loepke, A. W. & Soriano, S. G. An assessment of the effects of general anesthetics on developing brain structure and neurocognitive function. *Anesth Analg* **106**, 1681–1707 (2008).

111. Maloney, S. E. *et al.* Repeated neonatal isoflurane exposures in the mouse induce apoptotic degenerative changes in the brain and relatively mild long-term behavioral deficits. *Sci Rep* **9**, 1–14 (2019).

112. Fredriksson, A., Pontén, E., Gordh, T. & Eriksson, P. Neonatal exposure to a combination of N-Methyl-D-aspartate and γ-aminobutyric acid type A receptor anesthetic agents potentiates apoptotic neurodegeneration and persistent behavioral deficits. *Anesthesiology* **107**, 427–436 (2007).

113. Yu, D., Jiang, Y., Gao, J., Liu, B. & Chen, P. Repeated exposure to propofol potentiates neuroapoptosis and long-term behavioral deficits in neonatal rats. *Neurosci Lett* **534**, 41–46 (2013).

114. Walters, J. L. & Paule, M. G. Review of preclinical studies on pediatric general anesthesia-induced developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol Teratol* **60**, 2–23 (2017).

115. Aksenov, D. P., Miller, M. J., Dixon, C. J. & Drobyshevsky, A. Impact of anesthesia exposure in early development on learning and sensory functions. *Dev Psychobiol* **62**, 559–572 (2021).

116. Andropoulos, D. B. Effect of Anesthesia on the Developing Brain: Infant and Fetus. *Fetal Diagn Ther* **43**, 1–11 (2018).

117. Gutierrez, S. *et al.* Is age-dependent, ketamine-induced apoptosis in the rat somatosensory cortex influenced by temperature? *Neuroscience* **168**, (2010).

118. Deng, M. *et al.* Brain regional vulnerability to anaesthesia-induced neuroapoptosis shifts with age at exposure and extends into adulthood for some regions. *Br J Anaesth* **113**, 443–451 (2014).

119. Hofacer, R. D. *et al.* Cell age-specific vulnerability of neurons to anesthetic toxicity. *Ann Neurol* **73**, 695–704 (2013).

120. Krzisch, M. *et al.* Propofol anesthesia impairs the maturation and survival of adult-born hippocampal neurons. *Anesthesiology* **118**, (2013).

121. Rizzi, S., Ori, C. & Jevtovic-Todorovic, V. Timing versus duration: Determinants of anesthesia-induced developmental apoptosis in the young mammalian brain. *Ann N Y Acad Sci* **1199**, 43–51 (2010).

122. Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M. & Noble-Haeusslein, L. J. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol* **0**, 1 (2013).

123. Zeiss, C. J. Comparative Milestones in Rodent and Human Postnatal Central Nervous System Development. *Toxicol Pathol* **49**, 1368–1373 (2021).

124. Amrock, L. G., Starner, M. L., Murphy, K. L. & Baxter, M. G. Long-term Effects of Single or Multiple Neonatal Sevoflurane Exposures on Rat Hippocampal Ultrastructure. *Anesthesiology* **122**, 87–95 (2015).

125. Young, C. *et al.* Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain. *Br J Pharmacol* **146**, 189–197 (2005).

126. Zhou, Z.-W. W. *et al.* The glutaminergic, GABAergic, dopaminergic but not cholinergic neurons are susceptible to anaesthesia-induced cell death in the rat developing brain. *Neuroscience* **174**, 64–70 (2011).

127. Creeley, C. E. *et al.* Isoflurane-induced apoptosis of neurons and oligodendrocytes in the fetal rhesus macaque brain. *Anesthesiology* **120**, 626–638 (2014).

128. Brambrink, A. M. *et al.* Isoflurane-induced apoptosis of oligodendrocytes in the neonatal primate brain. *Ann Neurol* **72**, 525–535 (2012).

129. Noguchi, K. K. *et al.* Isoflurane exposure for three hours triggers apoptotic cell death in neonatal macaque brain. *BJA: British Journal of Anaesthesia* **119**, 524–531 (2017).

130. Rizzi, S., Carter, L. B., Ori, C. & Jevtovic-Todorovic, V. Clinical anesthesia causes permanent damage to the fetal guinea pig brain. *Brain Pathology* **18**, 198–210 (2008).

131. Slikker, W. *et al.* Ketamine-induced neuronal cell death in the perinatal rhesus monkey. *Toxicological Sciences* **98**, 145–158 (2007).

132. Stratmann, G. *et al.* Effect of hypercarbia and isoflurane on brain cell death and neurocognitive dysfunction in 7-day-old rats. *Anesthesiology* **110**, 849–861 (2009).

133. Liang, G. *et al.* Isoflurane causes greater neurodegeneration than an equivalent exposure of sevoflurane in the developing brain of neonatal mice. *Anesthesiology* **112**, 1325–1334 (2010).

134. Loepke, A. W. *et al.* The effects of neonatal isoflurane exposure in mice on brain cell viability, adult behavior, learning, and memory. *Anesth Analg* **108**, 90–104 (2009).

135. Zhou, Z.-B. Bin *et al.* Subclinical concentrations of sevoflurane reduce oxidative stress but do not prevent hippocampal apoptosis. *Mol Med Rep* **14**, 721–727 (2016).

136. Yang, B. *et al.* Comparison of Neurodegeneration and Cognitive Impairment in Neonatal Mice Exposed to Propofol or Isoflurane. *PLoS One* **9**, e99171 (2014).

137. Shen, X. *et al.* Early life exposure to sevoflurane impairs adulthood spatial memory in the rat. *Neurotoxicology* **39**, 45–56 (2013).

138. Satomoto, M. Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fear conditioning in mice. *Japanese Journal of Anesthesiology* **59**, 628–637 (2010).

139. Raper, J., Alvarado, M. C., Murphy, K. L. & Baxter, M. G. Multiple Anesthetic Exposure in Infant Monkeys Alters Emotional Reactivity to an Acute Stressor. *Anesthesiology* **123**, 1084–1092 (2015).

140. Gascoigne, D. A., Serdyukova, N. A. & Aksenov, D. P. Early development of the GABaergic system and the associated risks of neonatal anesthesia. *Int J Mol Sci* **22**, 4–8 (2021).

141. Robinson, E. J., Lyne, T. C. & Blaise, B. J. Safety of general anaesthetics on the developing brain: are we there yet? *BJA Open* **2**, 100012 (2022).

142. Richardson, D. S. & Lichtman, J. W. Clarifying Tissue Clearing. *Cell* **162**, 246 (2015).

143. Franks, N. P. General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat Rev Neurosci* **9**, 370–386 (2008).

144. Wasilczuk, A. Z., Maier, K. L. & Kelz, M. B. The Mouse as a Model Organism for Assessing Anesthetic Sensitivity. *Methods Enzymol* **602**, 211–228 (2018).

145. Ji, M. H. *et al.* Pre-administration of curcumin prevents neonatal sevoflurane exposure-induced neurobehavioral abnormalities in mice. *Neurotoxicology* **46**, 155–164 (2015).

146. Satomoto, M. *et al.* Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fear conditioning in mice. *Anesthesiology* **110**, 628–637 (2009).

147. Renier, N. *et al.* iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* **159**, 896–910 (2014).

148. iDISCO protocol – iDISCO method. https://idisco.info/idisco-%20protocol/.

149. GitHub - ychastagnier/General-Cell-Counter: General Cell Counter is a plugin for Fiji to pretreat and threshold images, then count cells. https://github.com/ychastagnier/General-Cell-Counter.

150. Areias, J. *et al.* Whole-brain characterization of apoptosis after sevoflurane anesthesia reveals neuronal cell death patterns in the mouse neonatal neocortex. *Sci Rep* **13**, 14763 (2023).

151. Andropoulos, D. B. & Greene, M. F. Anesthesia and Developing Brains - Implications of the FDA Warning. *N Engl J Med* **376**, 905–907 (2017).

152. Dikranian, K., Qin, Y. Q., Labruyere, J., Nemmers, B. & Olney, J. W. Ethanol-induced neuroapoptosis in the developing rodent cerebellum and related brain stem structures. *Brain Res Dev Brain Res* **155**, 1–13 (2005).

153. Istaphanous, G. K. *et al.* Characterization and quantification of isoflurane-induced developmental apoptotic cell death in mouse cerebral cortex. *Anesth Analg* **116**, 845–854 (2013).

154. Wang, Q., Li, Y., Tan, H. & Wang, Y. Sevoflurane-Induced Apoptosis in the Mouse Cerebral Cortex Follows Similar Characteristics of Physiological Apoptosis. *Front Mol Neurosci* **15**, (2022).

155. Rice, D. & Barone, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* **108**, 511–533 (2000).

156. Schenning, K. J. *et al.* Isoflurane exposure leads to apoptosis of neurons and oligodendrocytes in 20- and 40-day old rhesus macaques. *Neurotoxicol Teratol* **60**, 63 (2017).

157. Zanghi, C. N. & Jevtovic-Todorovic, V. A Holistic Approach to Anesthesia-Induced Neurotoxicity and its Implications for Future Mechanistic Studies. *Neurotoxicol Teratol* **60**, 24 (2017).

158. Ji, C., Ni, Q., Chen, W., Yang, Z. & Ma, D. General anesthetic neurotoxicity in the young: Mechanism and prevention. *Neurosci Biobehav Rev* **107**, 883–896 (2019).

159. Vutskits, L. & Xie, Z. Lasting impact of general anaesthesia on the brain: mechanisms and relevance. *Nat Rev Neurosci* **17**, 705–717 (2016).

160. Sun, M., Xie, Z., Zhang, J. & Leng, Y. Mechanistic insight into sevoflurane-associated developmental neurotoxicity. *Cell Biol Toxicol* **38**, 927 (2022).

161. Hogarth, K., Tarazi, D. & Maynes, J. T. The effects of general anesthetics on mitochondrial structure and function in the developing brain. *Front Neurol* **14**, 1179823 (2023).

162. Wang, J. & Liu, Z. Research progress on molecular mechanisms of general anesthetic-induced neurotoxicity and cognitive impairment in the developing brain. *Front Neurol* **13**, 1065976 (2022).

163. Liu, Y. *et al.* Influence of sevoflurane exposure on mitogen-activated protein kinases and Akt/GSK-3β/CRMP-2 signaling pathways in the developing rat brain. *Exp Ther Med* **15**, 2066 (2018).

164. Yufune, S. *et al.* Suppression of ERK phosphorylation through oxidative stress is involved in the mechanism underlying sevoflurane-induced toxicity in the developing brain. *Sci Rep* **6**, (2016).

165. Wang, W. Y. *et al.* The effects of metabotropic glutamate receptor 7 allosteric agonist N,N′-dibenzhydrylethane-1,2-diamine dihydrochloride on developmental sevoflurane neurotoxicity: role of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Neuroscience* **205**, 167–177 (2012).

166. Wang, W. Y. *et al.* N-stearoyl-l-tyrosine ameliorates sevoflurane induced neuroapoptosis via MEK/ERK1/2 MAPK signaling pathway in the developing brain. *Neurosci Lett* **541**, 167–172 (2013).

167. Wang, W. Y. *et al.* Location- and Subunit-Specific NMDA Receptors Determine the Developmental Sevoflurane Neurotoxicity Through ERK1/2 Signaling. *Mol Neurobiol* **53**, 216–230 (2016).

168. Zhang, Y. *et al.* The mitochondrial pathway of anesthetic isoflurane-induced apoptosis. *J Biol Chem* **285**, 4025–4037 (2010).

169. Sun, Z., Satomoto, M., Adachi, Y. U., Kinoshita, H. & Makita, K. Inhibiting NADPH oxidase protects against long-term memory impairment induced by neonatal sevoflurane exposure in mice. *BJA: British Journal of Anaesthesia* **117**, 80 (2016).

170. Zhu, X. *et al.* Sevoflurane increases intracellular calcium to induce mitochondrial injury and neuroapoptosis. *Toxicol Lett* **336**, 11–20 (2021).

171. Zhao, Y. *et al.* Anesthetic-Induced Neurodegeneration Mediated via Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **333**, 14 (2010).

172. Lu, L. X., Yon, J. H., Carter, L. B. & Jevtovic-Todorovic, V. General anesthesia activates BDNF-dependent neuroapoptosis in the developing rat brain. *Apoptosis* **11**, 1603–1615 (2006).

173. Head, B. P. *et al.* Inhibition of p75 neurotrophin receptor attenuates isoflurane-mediated neuronal apoptosis in the neonatal central nervous system. *Anesthesiology* **110**, 813–825 (2009).

174. Jevtovic-Todorovic, V. Exposure of Developing Brain to General Anesthesia: What Is the Animal Evidence? *Anesthesiology* **128**, 832–839 (2018).

175. Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J. L., Tyzio, R. & Khazipov, R. GABA: A pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev* **87**, 1215–1284 (2007).

176. Wang, D. D. & Kriegstein, A. R. Defining the role of GABA in cortical development. *J Physiol* **587**, 1873–1879 (2009).

177. Zhou, L., Sun, X. & Duan, J. NMDARs regulate the excitatory-inhibitory balance within neural circuits. *Brain Science Advances* **2023**, 3–14 (2023).

178. Ben-Ari, Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nature Reviews Neuroscience 2002 3:9* **3**, 728–739 (2002).

179. Peerboom, C. & Wierenga, C. J. The postnatal GABA shift: A developmental perspective. *Neurosci Biobehav Rev* **124**, 179–192 (2021).

180. Kirmse, K., Hübner, C. A., Isbrandt, D., Witte, O. W. & Holthoff, K. GABAergic Transmission during Brain Development: Multiple Effects at Multiple Stages. *Neuroscientist* **24**, 36–53 (2018).

181. Yamada, J. *et al.* Cl- uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *J Physiol* **557**, 829–841 (2004).

182. Ben-Ari, Y., Khalilov, I., Kahle, K. T. & Cherubini, E. The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *Neuroscientist* **18**, 467–486 (2012).

183. Rivera, C. *et al.* The K+/Cl- co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* **397**, 251–255 (1999).

184. Cabrera, O. H. *et al.* Sevoflurane-induced Dysregulation of Cation-Chloride Cotransporters NKCC1 and KCC2 in Neonatal Mouse Brain. *Mol Neurobiol* **57**, 1–10 (2020).

185. Lee, H., Chen, C. X. Q., Liu, Y. J., Aizenman, E. & Kandler, K. KCC2 expression in immature rat cortical neurons is sufficient to switch the polarity of GABA responses. *Eur J Neurosci* **21**, 2593–2599 (2005).

186. Lu, W., Bromley-Coolidge, S. & Li, J. Regulation of GABAergic synapse development by postsynaptic membrane proteins. *Brain Res Bull* **129**, 30–42 (2017).

187. Gu, X., Zhou, L. & Lu, W. An NMDA Receptor-Dependent Mechanism Underlies Inhibitory Synapse Development. *Cell Rep* **14**, 471–478 (2016).

188. Wang, D. D. & Kriegstein, A. R. GABA Regulates Excitatory Synapse Formation in the Neocortex via NMDA Receptor Activation. *Journal of Neuroscience* **28**, 5547–5558 (2008).

189. Zhou, Q. & Sheng, M. NMDA receptors in nervous system diseases. *Neuropharmacology* **74**, 69–75 (2013).

190. Lai, T. W., Shyu, W. C. & Wang, Y. T. Stroke intervention pathways: NMDA receptors and beyond. *Trends Mol Med* **17**, 266–275 (2011).

191. Edwards, D. A. *et al.* Bumetanide Alleviates Epileptogenic and Neurotoxic Effects of Sevoflurane in Neonatal Rat Brain. *Anesthesiology* **112**, 567–575 (2010).

192. Zhang, X., Shen, F., Xu, D. & Zhao, X. A lasting effect of postnatal sevoflurane anesthesia on the composition of NMDA receptor subunits in rat prefrontal cortex. *International Journal of Developmental Neuroscience* **54**, 62–69 (2016).

193. McMoneagle, E. *et al.* Neuronal K+-Cl- cotransporter KCC2 as a promising drug target for epilepsy treatment. *Acta Pharmacol Sin* **45**, 1–22 (2024).

194. Savardi, A., Borgogno, M., De Vivo, M. & Cancedda, L. Pharmacological tools to target NKCC1 in brain disorders. *Trends Pharmacol Sci* **42**, 1009–1034 (2021).

195. Schulte, J. T., Wierenga, C. J. & Bruining, H. Chloride transporters and GABA polarity in developmental, neurological and psychiatric conditions. *Neurosci Biobehav Rev* **90**, 260–271 (2018).

196. Burnashev, N. & Szepetowski, P. NMDA receptor subunit mutations in neurodevelopmental disorders. *Curr Opin Pharmacol* **20**, 73–82 (2015).

197. Sanz-Clemente, A., Nicoll, R. A. & Roche, K. W. Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *Neuroscientist* **19**, 62–75 (2013).

198. Yan, Y. *et al.* Integrated Excitatory/Inhibitory Imbalance and Transcriptomic Analysis Reveals the Association between Dysregulated Synaptic Genes and Anesthetic-Induced Cognitive Dysfunction. *Cells* **11**, (2022).

199. Li, W. Excitation and Inhibition Imbalance in Rett Syndrome. *Front Neurosci* **16**, (2022).

200. Morin-Parent, F., Champigny, C., Lacroix, A., Corbin, F. & Lepage, J. F. Hyperexcitability and impaired intracortical inhibition in patients with fragile-X syndrome. *Translational Psychiatry 2019 9:1* **9**, 1–9 (2019).

201. Monteverdi, A. *et al.* Subject-specific features of excitation/inhibition profiles in neurodegenerative diseases. *Front Aging Neurosci* **14**, (2022).

202. Liu, Y. *et al.* A Selective Review of the Excitatory-Inhibitory Imbalance in Schizophrenia: Underlying Biology, Genetics, Microcircuits, and Symptoms. *Front Cell Dev Biol* **9**, (2021).

203. Canitano, R. & Palumbi, R. Excitation/Inhibition Modulators in Autism Spectrum Disorder: Current Clinical Research. *Front Neurosci* **15**, 753274 (2021).

204. Mamiya, P. C., Arnett, A. B. & Stein, M. A. Precision Medicine Care in ADHD: The Case for Neural Excitation and Inhibition. *Brain Sci* **11**, 1–12 (2021).

205. Cabrera, O. H., Useinovic, N. & Jevtovic-Todorovic, V. Neonatal anesthesia and dysregulation of the epigenome. *Biol Reprod* **105**, 720 (2021).

206. Jiang, Y., Zhou, Y., Tan, S., Xu, C. & Ma, J. Role of posttranslational modifications in memory and cognitive impairments caused by neonatal sevoflurane exposure. *Front Pharmacol* **14**, (2023).

207. Ma, L. H., Yan, J., Jiao, X. H., Zhou, C. H. & Wu, Y. Q. The Role of Epigenetic Modifications in Neurotoxicity Induced by Neonatal General Anesthesia. *Front Mol Neurosci* **15**, (2022).

208. Jimenez-Tellez, N. *et al.* Sevoflurane Exposure in Neonates Perturbs the Expression Patterns of Specific Genes That May Underly the Observed Learning and Memory Deficits. *Int J Mol Sci* **24**, (2023).

209. Wu, Z. & Zhao, P. Epigenetic Alterations in Anesthesia-Induced Neurotoxicity in the Developing Brain. *Front Physiol* **9**, (2018).

210. Jiang, Y., Zhou, Y., Tan, S., Xu, C. & Ma, J. Role of posttranslational modifications in memory and cognitive impairments caused by neonatal sevoflurane exposure. *Front Pharmacol* **14**, (2023).

211. Dalla Massara, L. *et al.* General Anesthesia Causes Epigenetic Histone Modulation of c-Fos and Brain-derived Neurotrophic Factor, Target Genes Important for Neuronal Development in the Immature Rat Hippocampus. *Anesthesiology* **124**, 1311–1327 (2016).

212. Ju, L. S. *et al.* Role of epigenetic mechanisms in transmitting the effects of neonatal sevoflurane exposure to the next generation of male, but not female, rats. *Br J Anaesth* **121**, 406–416 (2018).

213. Yu, X. *et al.* Cancer epigenetics: from laboratory studies and clinical trials to precision medicine. *Cell Death Discovery 2024 10:1* **10**, 1–12 (2024).

214. Berson, A., Nativio, R., Berger, S. L. & Bonini, N. M. Epigenetic Regulation in Neurodegenerative Diseases. *Trends Neurosci* **41**, 587–598 (2018).

215. Silk, T., Dipnall, L., Wong, Y. T. & Craig, J. M. Epigenetics and ADHD. *Curr Top Behav Neurosci* **57**, 269–289 (2022).

216. Reichard, J. & Zimmer-Bensch, G. The Epigenome in Neurodevelopmental Disorders. *Front Neurosci* **15**, 776809 (2021).

217. Wu, Y. L. *et al.* Epigenetic regulation in metabolic diseases: mechanisms and advances in clinical study. *Signal Transduction and Targeted Therapy 2023 8:1* **8**, 1–27 (2023).

218. Rattay, K. & Robinson, L. R. Identifying Risk Factors for Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): a Public Health Concern and Opportunity. *Prev Sci* **25**, 195–202 (2024).

219. Li, G. *et al.* Role of NR2B/ERK signaling in the neuroprotective effect of dexmedetomidine against sevoflurane induced neurological dysfunction in the developing rat brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **81**, 271–278 (2021).

220. Sun, J. & Nan, G. The extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in neurological diseases: A potential therapeutic target (Review). *Int J Mol Med* **39**, 1338–1346 (2017).

221. Ding, M. L., Ma, H., Man, Y. G. & Lv, H. Y. Protective effects of a green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, against sevoflurane-induced neuronal apoptosis involve regulation of CREB/BDNF/TrkB and PI3K/Akt/mTOR signalling pathways in neonatal mice. *Can J Physiol Pharmacol* **95**, 1396–1405 (2017).

222. Zhao, J. *et al.* Repeated exposure to sevoflurane in neonatal rats impairs cognition in adulthood via the PKA-CREB-BDNF signaling pathway. *Exp Ther Med* **22**, (2021).

223. Useinovic, N., Maksimovic, S., Near, M., Quillinan, N. & Jevtovic-Todorovic, V. Do We Have Viable Protective Strategies against Anesthesia-Induced Developmental Neurotoxicity? *International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23, Page 1128* **23**, 1128 (2022).

224. Ji, M. H. *et al.* Pre-administration of curcumin prevents neonatal sevoflurane exposure-induced neurobehavioral abnormalities in mice. *Neurotoxicology* **46**, 155–164 (2015).

225. Pellegrini, L. *et al.* Erythropoietin protects newborn rat against sevoflurane-induced neurotoxicity. *Pediatric Anesthesia* **24**, 749–759 (2014).

226. Tang, X. *et al.* Resveratrol Mitigates Sevoflurane-Induced Neurotoxicity by the SIRT1-Dependent Regulation of BDNF Expression in Developing Mice. *Oxid Med Cell Longev* **2020**, (2020).

227. Martynyuk, A. E., Ju, L.-S., Morey, T. E. & Zhang, J.-Q. Neuroendocrine, epigenetic, and intergenerational effects of general anesthetics. *World J Psychiatry* **10**, 81–94 (2020).

228. Hu, Y. *et al.* The neuroprotective effect of dexmedetomidine and its mechanism. *Front Pharmacol* **13**, 965661 (2022).

229. Alam, A. *et al.* Neuroprotection and neurotoxicity in the developing brain: an update on the effects of dexmedetomidine and xenon. *Neurotoxicol Teratol* **60**, 102–116 (2017).

230. Unchiti, K. *et al.* The potential role of dexmedetomidine on neuroprotection and its possible mechanisms: Evidence from in vitro and in vivo studies. *European Journal of Neuroscience* **54**, 7006–7047 (2021).

231. Tsivitis, A. *et al.* Anesthesia, the developing brain, and dexmedetomidine for neuroprotection. *Front Neurol* **14**, 1150135 (2023).

232. Dahmani, S., Rouelle, D., Gressens, P. & Mantz, J. Effects of dexmedetomidine on hippocampal focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation in physiologic and ischemic conditions. *Anesthesiology* **103**, 969–977 (2005).

233. Yang, X. *et al.* Effects of Dexmedetomidine on Emergence Agitation and Recovery Quality Among Children Undergoing Surgery Under General Anesthesia: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Front Pediatr* **8**, (2020).

234. Yu, H., Kang, H., Fan, J., Cao, G. & Liu, B. Influence of dexmedetomidine on postoperative cognitive dysfunction in the elderly: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Brain Behav* **12**, (2022).

235. Liang, X. *et al.* Effect of repeated neonatal sevoflurane exposure on the learning, memory and synaptic plasticity at juvenile and adult age. 10.

236. Liaquat, Z., Xu, X., Zilundu, P. L. M., Fu, R. & Zhou, L. The Current Role of Dexmedetomidine as Neuroprotective Agent: An Updated Review. *Brain Sciences 2021, Vol. 11, Page 846* **11**, 846 (2021).

237. Moutin, E. *et al.* Procedures for Culturing and Genetically Manipulating Murine Hippocampal Postnatal Neurons. *Front Synaptic Neurosci* **12**, (2020).

238. Goyet, E., Bouquier, N., Ollendorff, V. & Perroy, J. Fast and high resolution single-cell BRET imaging. *Scientific Reports 2016 6:1* **6**, 1–12 (2016).

239. Castro, L., Yapo, C. & Vincent, P. Physiopathologie de la signalisation AMPc/PKA dans les neurones. *Biol Aujourdhui* **210**, 191–203 (2016).

ANNEXES

ANNEXE 1 : PUBLICATION

www.nature.com/scientificreports

scientific reports

Check for updates

OPEN

Whole-brain characterization of apoptosis after sevoflurane anesthesia reveals neuronal cell death patterns in the mouse neonatal neocortex

Julie Areias[1,3], Chrystelle Sola[1,2,3], Yan Chastagnier[1], Julien Pico[1,2], Nathalie Bouquier[1], Christophe Dadure[1,2], Julie Perroy[1] & Vivien Szabo[1,2]✉

In the last two decades, safety concerns about general anesthesia (GA) arose from studies documenting brain cell death in various pharmacological conditions and animal models. Nowadays, a thorough characterization of sevoflurane-induced apoptosis in the entire neonatal mouse brain would help identify and further focus on underlying mechanisms. We performed whole-brain mapping of sevoflurane-induced apoptosis in post-natal day (P) 7 mice using tissue clearing and immunohistochemistry. We found an anatomically heterogenous increase in cleaved-caspase-3 staining. The use of a novel P7 brain atlas showed that the neocortex was the most affected area, followed by the striatum and the metencephalon. Histological characterization in cortical slices determined that post-mitotic neurons were the most affected cell type and followed inter- and intracortical gradients with maximal apoptosis in the superficial layers of the posterodorsal cortex. The unbiased anatomical mapping used here allowed us to confirm sevoflurane-induced apoptosis in the perinatal period, neocortical involvement, and indicated striatal and metencephalic damage while suggesting moderate hippocampal one. The identification of neocortical gradients is consistent with a maturity-dependent mechanism. Further research could then focus on the interference of sevoflurane with neuronal migration and survival during development.

Millions of infants worldwide require general anesthesia every year. In the United States of America, for instance, 15% of children undergo at least one general anesthesia before the age of three[1]. However, experimental results from the past two decades have raised serious safety concerns about the exposure of the developing brain to general anesthetic agents. One of the pioneering pre-clinical studies performed in rats showed that N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptors blockade using ketamine during the perinatal period resulted in widespread brain neuronal cells apoptosis[2]. Since then, numerous studies have explored the impact of neonatal exposure to various anesthetic agents on brain maturation, and the potential long-term consequences on behavioral and cognitive development in various animal species as well as in humans[3–5]. Alerted by these data, the Food and Drug Administration (FDA) posted a drug safety communication[6,7] explicitly warning against high-risk exposure to anesthesia during infancy, defined as either repeated or lasting more than 3 h. Approximately 25% of children under 3 years of age who undergo a procedure fall into this category[1].

Most pharmacological agents commonly administered to induce general anesthesia, including volatile anesthetic agents widely used in the pediatric population, interfere with γ-aminobutyric acid (GABAergic), glutamatergic, or both type of synaptic transmission, either by increasing GABA-A receptor open-state probability, or blocking NMDA receptors[8–10]. Regardless of the underlying cellular mechanisms, neurodegeneration after exposure to GABA-A receptors agonists and NMDA receptors antagonists is now supported by a large corpus of data, and presents some interesting features (for reviews, see[3,10–12]). First, it appears to be age-dependent. The period of greatest vulnerability to anesthetic agents' exposure corresponds to the brain growth spurt, i.e. the peak of rapid synaptogenesis, occurring at approximately 7 days of life in rodents[2,13–19]. Physiological brain

[1]IGF, University of Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France. [2]Montpellier University Hospital, 191 Av. du Doyen Gaston Giraud, 34295 Montpellier Cedex 05, France. [3]These authors contributed equally: Julie Areias and Chrystelle Sola. ✉email: vivien.szabo@igf.cnrs.fr

maturation involves a process of programmed cell death, i.e. developmental apoptosis[20], in which the GABAergic and glutamatergic systems play a crucial role in modulating neuronal progenitor proliferation, migration, and maturation[21–23]. Therefore, anesthetic agents' interference with GABAergic and/or glutamatergic transmission during early brain development is likely to result in some perturbation of programmed cell death[4,10,23]. Second, toxicity also appears to be dose-dependent[3,13,24–28] and the combination of a GABA-A receptor agonist and a NMDA receptor antagonist has been reported to be another worsening factor[29]. Finally, this increased apoptosis has been associated with functional abnormalities, including long-term cognitive and behavioral impairment in rodent models[11,17,24,27–30], and similar findings have been replicated in non-human primates[5,31], supporting the pathological nature of this cellular loss and legitimating the concern for young children.

Interestingly, the anatomical distribution of anesthesia-induced apoptosis does not appear homogeneous throughout the brain[3,12,15–18,27,32]. However, interpretation of the anatomical and histological variability of the reported damage is impaired, for one part by the use of different animal models including rodents, guinea pigs, piglets and non-human primates[19,33–37], and for the other by the use of different anesthetic agents.

Therefore, even though the pro-apoptotic effects of anesthetic agents seem well-established and despite years of extensive research, the precise mechanism of anesthesia-induced neurotoxicity and the subsequent potential implications for the practice of pediatric anesthesia are still debated. Research efforts remain necessary in order to better understand their underlying mechanisms and then optimize anesthesia drugs and methods used to limit their potential side-effects. We propose that the effects of sevoflurane, the most widely inhaled anesthetic agent used in pediatric population, should be thoroughly examined. In this study, we present an unbiased anatomical mapping of cell apoptosis induced by sevoflurane exposure during postnatal brain development in mice, followed by histological characterization of cells in the areas identified as most affected.

Results

Whole brain mapping and quantification of anesthesia-induced apoptosis. We first aimed to provide whole-brain maps of sevoflurane-induced apoptosis in P7 mice. In the control group, c-caspase-3 immunostaining was detected in 0.507 [0.482–0.922] % of the brain volume. After exposure to sevoflurane, the volume fraction of c-caspase-3 increased significantly, reaching 1.63 [1.56–1.77] % ($p = 3.00 \times 10^{-3}$) of brain volume (Fig. 1a,b). These results suggest a high sensitivity of the developing brain to anesthesia exposure resulting in an increase in apoptosis.

Anatomical distribution of neonatal anesthesia-induced apoptosis. In order to characterize the anatomical distribution of c-caspase-3 positive cells after sevoflurane exposure during the neonatal period, we developed a numerical atlas of the P7 mouse brain for semi-automated registration and segmentation (Fig. 1c and Methods). The following seven brain regions have been segmented: myelencephalon, metencephalon/midbrain, diencephalon, hippocampus, neocortex, striatum, and cerebellum. After exposure to sevoflurane, the c-caspase-3 volume fraction was significantly increased in the neocortex (2.47 [2.21–2.86] versus 0.676 [0.602–0.740] %; $p = 4.99 \times 10^{-4}$), as well as in the striatum (1.38 [0.723–2.57] vs. 0.471 [0.390–0.616] %; $p = 1.10 \times 10^{-2}$), and in the metencephalon (1.18 [0.991–1.51] vs. 0.564 [0.293–0.727] %; $p = 7.49 \times 10^{-3}$) (Fig. 1d). In other brain regions, the c-caspase-3 volume fraction showed a tendency to increase, with no statistical significance. These results suggest that, despite intense and diffuse apoptosis after neonatal sevoflurane exposure, vulnerability is brain region dependent. In the present results, the neocortex was particularly affected.

Histological characterization of cortical apoptotic cells. Results from whole-brain mapping showed that the brain area most severely affected by sevoflurane-induced cell apoptosis was the neocortex. We then focused on characterizing the spatial cortical distribution and the cytological nature of the apoptotic cells affected by anesthesia-induced apoptosis.

First, immunostainings showed macroscopic cortical antero-posterior and ventro-dorsal gradients of apoptotic cells. The median volume fraction of c-caspase-3 labeled cells was 1.79 [1.69–2.43] % in the anterior cortex, significantly lower than in the medial (2.70 [2.32–3.11]; $p = 4.17 \times 10^{-2}$) and posterior cortices (2.94 [2.68–3.14] %; $p = 1.10 \times 10^{-2}$). Similarly, the volume of c-caspase-3 labeled cells was lower in ventral cortex (1.62 [1.26–1.78] %) than in the lateral (2.56 [2.15–2.77] %; $p = 4.17 \times 10^{-2}$) and the dorsal (2.88 [2.56–3.35] %; $p = 6.45 \times 10^{-5}$) ones (Fig. 2a). Second, this experiment also highlighted intracortical interlaminar gradients. In the dorsal cortex, the majority of c-caspase-3 positive cells, accounting for 51.1 [43.5–60.0] %, were located in superficial layer II (Fig. 2b,c). In contrast, in the ventral cortex, deep layers V-VI contained the greatest proportion of c-caspase-3 positive cells, 38.1 [21.4–50.0] %, whereas superficial layer II was less affected, representing only about one quarter of the c-caspase-3 labeled cells. No difference was found when considering the antero-posterior axis. These results support differential vulnerability to sevoflurane according to cortical areas, the superficial layer of the postero-dorsal part of the neonatal neocortex being the most affected in the current work. These could be related to differential timing in neurogenesis and maturation in a brain region-dependent manner.

Finally, we characterized the cell types of c-caspase-3 positive cells using co-immunostainings (Fig. 2d). The vast majority of apoptotic cells, accounting for 69.7%, were NeuN positive, 24.6% of which were co-labeled with the GABAergic marker GAD67 (Fig. 2e). Glial cell staining represented only 0.87% of c-caspase-3 positive cells, divided into 0.645% astrocytic GFAP and 0.223% oligodendrocytic Sox10 positive cells. The remaining 30% of c-caspase-3 positive cells did not stain with any of the above-mentioned markers. These data suggest that sevoflurane-induced apoptosis mainly affected post-mitotic neurons, of which 24.6% were GABAergic neurons. In contrast, glial cells, both oligodendrocytes and astrocytes appear to be almost not affected.

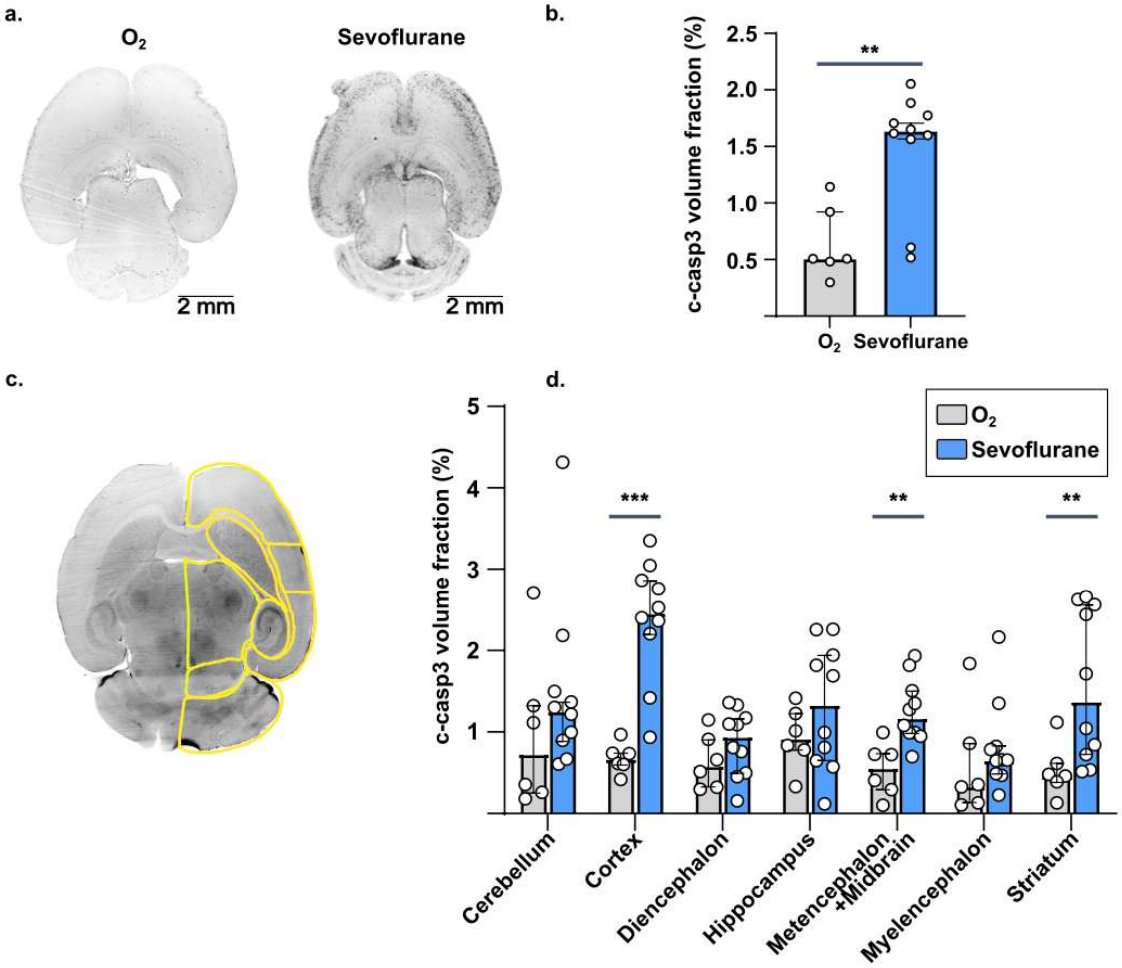


Figure 1. Whole brain mapping of apoptosis after sevoflurane anesthesia. (**a**) Examples of fluorescence images of c-caspase-3 immunostaining of mice brains after oxygen or sevoflurane exposure at P7. (**b**) Whole-brain quantification of c-caspase-3 staining volume fraction. (**c**) Example view of the 3D atlas used for anatomical segmentation of P7 brains. (**d**) Anatomical quantification of c-caspase-3 staining volume fraction at P7. $^{**}p \leq 0.01$, $^{***}p \leq 0.001$. Data are presented as median (± IQR). n = 6 (O_2), 10 (Sevoflurane).

Discussion

In order to establish a complete and accurate mapping of the potential cellular damage induced by anesthetics, we used an innovative whole-brain approach. In contrast to the vast majority of previous studies that have explored anesthetic-induced neurotoxicity, the clarification method allowed us to obtain images of entire intact mice brains and thus to avoid anatomical bias induced by incomplete tissue sampling after slicing. Our unbiased whole-brain immunohistochemical approach revealed a high sensitivity of the immature brain (P7) to sevoflurane-induced apoptosis, particularly affecting the neocortex. Moreover, the distribution of c-caspase-3 cells was not uniform in the neocortex following a cortical gradient both antero-posteriorly and ventro-dorsally, with the postero-dorsal part of the neonatal neocortex mostly affected in the current work. Furthermore, a radial intracortical gradient was observed such that the deep layers (V-VI) seemed to be more affected in the ventral cortex, while the superficial layers (II) were mainly impacted in the dorsal one. Finally, cytological characterization showed that most of the apoptotic cells were post-mitotic neurons, of which about one quarter were GABAergic cells.

The method used in the present studies presents two key advantages. First, it is free of anatomical bias, since entire brains are screened for apoptotic cells. This top-down approach allows secondary focus on regions of interest, defined a posteriori, in contrast to a priori targets in tissue slices, usually limited in number. Second, the analysis pipeline is largely automated and user-independent. This ensures high reproducibility, and also frees a significant amount of time for the experimenter. However, it should be noted that sensitivity usually achieved in slices is probably higher than the one reached here. One could increase this sensitivity, first, by using a higher

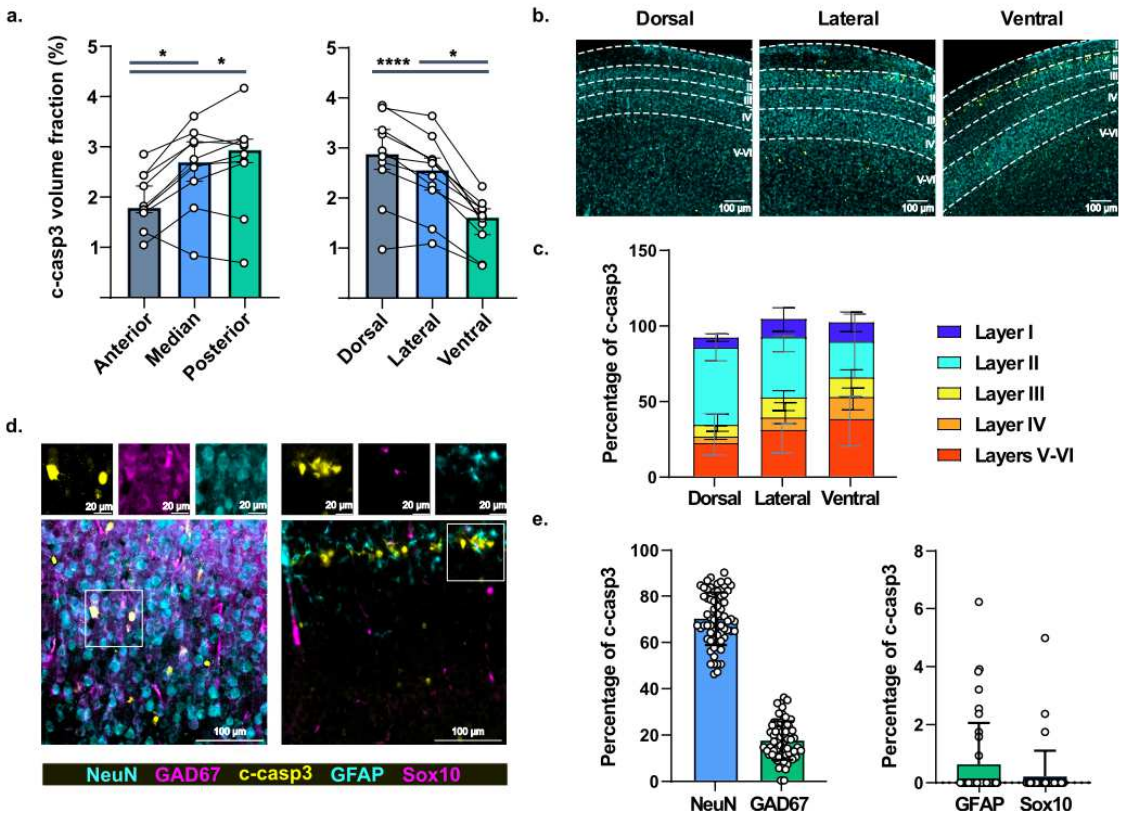


Figure 2. Characterization of neocortical apoptosis after sevoflurane anesthesia at P7. (**a**) Anatomical gradients of c-caspase-3 staining volume fraction, n = 10. (**b**) Examples of fluorescence images acquired in the neocortex showing the intracortical distribution of c-caspase-3 positive cells. (**c**) Quantification of the distribution of intracortical c-caspase-3 positive cells, n = 14 (dorsal), 15 (lateral), 10 (ventral). (**d**) Examples of fluorescence images acquired after immunostainings for intracortical characterization of c-caspase-3 positive cells. Boxes show higher magnification images in single channels. (**e**) Quantification of the fraction of cortical cells co-staining with c-caspase-3, n = 65 (left), 41 (right). $*p \leq 0.05$; $****p \leq 0.0001$. Data are presented as median (± IQR) except in e. for which data are presented as mean (± s.d.).

acquisition resolution, but hence getting a larger data volume in a longer acquisition time, and second, by setting a threshold for signal at a lower value, while accepting a smaller specificity.

The anatomical distribution of apoptotic cells depicted in this study is consistent with the reported data collected from brain slices, indicating particular vulnerability of the neocortex. However, it has been shown that a variety of regions can be more or less affected by anesthesia-induced cell apoptosis[3,12,15–18,27,32], including cortical and subcortical areas to various extents. In the present report, the anatomical distribution of c-caspase-3 staining was significantly increased in the striatum after neonatal sevoflurane exposure, in contrast to the results of a similar study that exposed mice to a general anesthetic in the early postnatal period[17]. Additionally, the hippocampal apoptotic damage reported here appeared to be limited compared to data published elsewhere[15]. These discrepancies may be due to a different anesthesia protocol including dosing, exposure time and pharmacological agents. Indeed, in the two studies mentioned above, isoflurane, the other commonly used volatile anesthetic in clinical practices, was used in contrast to sevoflurane in the present study. In fact, differential neuronal cell death after exposure to sevoflurane compared to isoflurane has been previously demonstrated, suggesting a plausible explanation for these contrasting results[38]. In addition, slight variations in the age of exposure between studies or use of different mice strains could lead to this sort of interstudy variability. Finally, these disparities could also arise from incomplete sampling of sliced brain. The unbiased histological approach used here allows for whole brain screening, without preconceived expectations. This facilitates further analysis of regions of particular interest. In the present work, we focused on the area most affected by sevoflurane-induced apoptosis.

As reported in various data collected from brain slices, the present whole-brain approach indicates a particular vulnerability of the neocortex to sevoflurane-induced apoptosis[2,15,17,27,32]. We observed cortical gradients of c-caspase-3 both along the antero-posterior and ventro-dorsal axes, and also between different cortical layers. These patterns could be related to differential brain maturation in a region-dependent manner and related to

physiological developmental apoptosis. It is commonly accepted that during the two first postnatal weeks in rodent, apoptosis is a physiological phenomenon crucial for proper brain development[20,39,40]. This programmed cell death is known to affect cortical neurons in an area- and layer-dependent manner such that developmental apoptosis does not appear homogeneous between functionally diverse neocortical areas or even between layers within the same cortical area[40–42]. Previous studies investigated whether anesthesia-induced apoptosis affects the same cell population as the one undergoing physiological developmental apoptosis, focusing on primary somatosensory cortex. The authors reported that cell death first affected the deep layer V at P5 and shifted to the superficial layers II–IV by P9[43,44]. Furthermore, while neuronal apoptosis was significantly increased in mice exposed to intravenous or volatile anesthesia, the histological patterns appeared similar to the physiological developmental ones. It would therefore seem that exposure to anesthetic agents pathologically increases physiological cell death[45,46]. Our data also suggest so, reporting similar interlayer cortical apoptosis gradients after sevoflurane exposure in the neonatal period.

We furthermore found that these patterns were not homogeneous across the whole neocortex and depended on the cortical area. Such regional disparities may result from spatial differences in the maturation processes and/or in the activity in different brain areas [42]. It is plausible that anesthetic agents would affect the excitatory/inhibitory balance and trigger neuronal death[4,10,12,23,40]. For instance, $GABA_A$-R are thought to generate excitatory post-synaptic currents during the early development, and only later shift to inhibitory ones depending on chloride ion Nernst potential[3]. Furthermore, NMDA-R blockade could lead to rapid up-regulation of their membrane expression[4,10]. Both mechanisms could involve excitability dysregulation in anesthesia-induced cell death. Besides, it has been convincingly shown that $GABA_A$-R activation can impact neuronal radial migration[22,47]. The above-mentioned phenomena would increase neuronal death in a maturation-dependent manner and lead to the differential patterns observed in this study.

Finally, we found that post-mitotic neurons accounted for the vast majority of apoptotic cells. These results are consistent with the literature[2,10,32,48], since most studies indicate that neuronal cells are particularly affected by anesthesia-induced apoptosis, with a variable proportion of GABAergic neurons involved[3,32]. In concordance, our data showed that 24.6% of apoptotic post-mitotic neurons were GABAergic. Although this rate is almost 10 times higher than reported elsewhere[48], it is consistent with other results[44]. These differences may arise from the important dependance on age of GABAergic neurons susceptibility to sevoflurane[44]. Significant damage to glial cells, particularly oligodendrocytes in the white matter has also been reported in fetal and neonatal non-human primate brains after exposure to volatile anesthesia while astrocytes appeared to be spared[3,33–35,48]. These contrasting results can stem from various causes. First, we did not perform quantification in the white matter since the initial whole-brain screening did not point towards it. Second, periods of cell proliferation and differentiation appear to increase sensitivity to anesthesia-induced neurotoxicity, as evidenced by the diffuse neuronal apoptosis associated with exposures during the first week of life in rodents. In contrast to neurons, glial cells proliferation occurs later, mainly between the second and third week of life in rodents[49]. Finally, the few publications on anesthesia-induced oligodendrocyte toxicity have been performed in non-human primates whose timing of brain development and maturation processes is different from that of rodents. These elements could explain why oligodendrocytes were virtually unaffected in the present study. Finally, we were not able to determine the cell type of about 30% of the apoptotic cells. We can only suspect that these were undergoing differentiation and did not express the usual markers.

The loss of neurons by apoptosis described here after exposure of the developing brain to sevoflurane has been described for all commonly used anesthetic drugs, including propofol, other volatile anesthetics (isoflurane, desflurane), ketamine, benzodiazepines. Furthermore, this increased apoptosis has been associated with functional abnormalities, including long-term cognitive and behavioral impairment in rodent models[11,17,24,27–30], as well as in non-human primates with similar findings replicated[5,31]. Although neuroapoptosis is a normal part of mammalian development, these extensive experimental data support the pathological nature of this cell loss. However, how these results can translate to human remains uncertain. Data from human trials, the vast majority of which being retrospective and presenting numerous confounding factors related to patient comorbidities, duration and surgery type, and environmental factors, are mixed, some of them showing neurodevelopmental disorders in children exposed to general anesthesia in their infancy, while others found no association[50].

Further research is still needed to better understand the mechanisms of neuronal loss and dysfunction observed after exposure to anesthesia and their possible long-term consequences. The present work shows unbiased quantification of sevoflurane anesthesia-induced apoptosis as well as histological identification and characterization in the neocortex, the most affected brain region. This whole-brain screening provides a valuable step before more detailed explorations, since anatomical disparities in anesthesia-induced cellular modifications are now established, down to region-dependent impact on the transcriptome and the epigenome[51,52]. Next steps would include identification of signaling pathways, from membrane receptors to the activation of caspase cascades encompassing critical kinases such as ERK, shown to be downregulated by sevoflurane in non-GABAergic cells[53]. Finally, testing of potential neuroprotective compounds, free of GABAergic or glutamatergic effects such as alpha-2 adrenoceptor agonists (i.e. dexmedetomidine)[10] will be of promising interest to increase our understanding of the mechanics of general anesthesia with potential direct impact on clinical practice.

Methods

All methods are reported in accordance with ARRIVE guidelines.

Animals. All animal procedures were conducted in accordance with the European Communities Council Directive, supervised by the IGF institute's local Animal Welfare Unit (national registration number A34-172-41, procedure number HCR#140). Animals exposed to experiment were obtained from experimentally naïve

timed-pregnant C57Bl/6 J mice (Janvier Labs). The offspring remained housed with the dam until experiment (P0 defined as the day of birth) and maintained in a 12-h light/dark cycle (lights on 7:30 AM to 7:30 PM), in stable conditions of temperature (22 ± 2 °C) and humidity (60%), with food and water provided ad libitum. The weight and general appearance of all mice were carefully monitored throughout the experiment. Efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Anesthesia protocol. Litter-matched mice pups were randomly assigned to the sevoflurane or control (no anesthesia) groups. In the sevoflurane group, animals were exposed at P7 to 3% sevoflurane (agent specific vaporizer in O_2 100% as gas carrier) for 3 consecutive periods of 2 h separated by the amount of time necessary for the mice to regain righting reflex (approximately 5 min) in a pre-warmed Plexiglas chamber kept on a heating plate at 37 °C. In the non-exposed group, the animals were placed under identical condition in O_2 100% for the same duration and at the same developmental stage (i.e. P7). The gas flow was 1 $L.min^{-1}$. We did not monitor the animals' body temperature nor arterial blood gas. However, we chose an anesthetic protocol consistent with the literature on neonatal reporting no alteration of pH, arterial oxygen and carbon dioxide tensions, arterial oxygen saturation or cerebral blood flow in anesthetic conditions similar to that used in the present study[54,55]. In addition, it has been convincingly shown that body temperature does not correlate with c-caspase-3 staining[14].

Immediately following treatment, mice were euthanized by decapitation, brains were carefully removed and postfixed overnight at 4 °C in 4% paraformaldehyde (PFA) in a sodium phosphate buffer (PBS).

Whole-brain clearing and immunolabeling of c-caspase-3 positive cells. The iDISCO + (immunolabeling-enabled three-dimensional imaging of solvent-cleared organs) method was used for whole brain immunolabeling according to the original published protocol[56], briefly described here:

Tissue preparation: The fixed samples were incubated in methanol/H_2O series in gradually increasing concentrations of methanol until complete dehydration and incubated overnight in 67% dichloromethane/33% methanol. Samples were then bleached with fresh 5% H_2O_2 in methanol at 4 °C overnight. Subsequently, the samples were rehydrated in methanol/H_2O series in gradually decreasing concentrations of methanol. Before immunolabeling, samples were incubated in permeabilization solution (0.2% Triton X-100/20% DMSO/0.3 M glycine) at 37 °C overnight, then blocked in PBS/0.2% Triton X-100/10% DMSO/6% Donkey Serum for 2 days at 37 °C.

Immunolabeling: Pre-treated samples were incubated in rabbit anti-cleaved caspase-3 primary antibody (1:500, Cell Signaling 9661) in PBS 0.2% Tween-20 with heparin (PTwH)/5% DMSO/3% Donkey Serum solution at 37 °C for 10 days. Samples were then washed in PTwH for 1 day, then incubated with a donkey anti rabbit Alexa 647 secondary antibody (1:500–Thermo Fisher A-315) in PTwH/3% Donkey Serum solution at 37 °C for 10 additional days. Samples were finally washed in PTwH for 2 days before clearing.

Clearing: The brains were dehydrated as previously described in a methanol/H_2O series at room temperature and incubated in 67% dichloromethane/33% methanol for 3 h with shaking. The samples were then washed in 100% dichloromethane twice and finally transferred to dibenzyl ether until imaging. N.B. Organic solvents should be handled under a chemical hood. Dibenzyl ether is a skin irritant exhibiting moderate toxicity, it should be handled with gloves.

Immunohistochemistry on brain slices. *Tissue preparation*: The fixed samples were rinsed with PBS and free-floating sections of 30 µm thickness were obtained using a Leica vibratome VT1000S.

Antibodies: To determine the phenotype of cells identified as apoptotic, different co-labelings were applied using the following primary antibodies: Rabbit polyclonal anti-cleaved caspase-3 (1:400–Cell Signaling); mouse monoclonal anti-glutamate- decarboxylase isoform 67 (GAD67, 1:1000–Millipore), anti-SRY-box 10 (Sox10, 1:1000–Novus); chicken polyclonal anti-neuronal nuclei (NeuN–1:500–Synaptic Systems), anti-GFAP (1:1000 Abcam). Following fluorophore-labeled secondary donkey-antibodies were used: anti-rabbit Cy3-conjugated (1:500–Jackson ImmunoResearch), anti-chicken Alexa 680-conjugated (1:500–Jackson ImmunoResearch), anti-mouse Alexa 488-conjugated (1:500–Invitrogen).

Immunohistochemistry: Floating sections were blocked for 1 h at room temperature with PBS, 5% (v/v) Normal Donkey Serum, 0.5% (w/v) Bovine Albumin Serum (BSA), 0.1% (v/v) Tween-20 (T20) before incubation overnight at 4 °C with primary antibodies diluted in antibodies solution (PBS 1X, 0.5% BSA, 0.1% T20). After washing three times in PBS, the sections were incubated for 1 h at room temperature with complementary secondary antibodies diluted in antibodies solution. Nuclei were stained with Hoechst-33342 (Sigma) solution diluted at 1:1000 in PBS for 10 min. After three PBS washes, sections were mounted in Dako mounting medium (Dako).

Whole brain 3D light sheet fluorescence microscope imaging. Whole-brain samples were imaged in an axial orientation on the Ultramicroscope (Miltenyi Biotec) setup equipped with a sCMOS camera and a 2 × /0.5 objective lens (MV PL-APO – Olympus) with a 5.7 mm working distance. Whole brains were imaged in a chamber filled with dibenzyl ether. The ImSpector Pro control software was used. Images were acquired at 0.63 × magnification with an exposure time of 100 ms in a z-stack with 3.5 µm intervals (0.035 NA–7 µm thickness light-sheet). Data were acquired in two channels: Autofluorescence and antibody-specific channel. Autofluorescence was acquired at excitation wavelength of 488 nm and emission wavelength of 525/50 nm. Antibody-specific channel was acquired at excitation wavelength of 639 nm and emission of 680/30 nm.

Fixed slices microscopic imaging. Immunofluorescence two dimensional images were generated using a Leica SP8-UV laser scanning confocal microscope (PL-APO 10X, 0.4 NA, imaging medium Leica) for sections co-stained with NeuN and GAD67, or a Zeiss AxioImager Z1 microscope (PL-NEO 10X, 0.3 NA) for

sections co-stained with Sox10 and GFAP. Emission and excitation filters proper to each fluorophore were used sequentially: Cy3 excitation 545/25 nm and emission 605/70 nm, Alexa 680 excitation 665/45 nm and emission 725/50 nm, Alexa 488 excitation 475/40 nm and emission 530/50 nm.

Image analysis. *Three-dimensional image processing*. Fiji software was used to register image stacks onto each other. To do so, a line was drawn for each brain between two easily recognizable landmarks. The direction of the line was used to rotate the images, so all brains have the same orientation. The length of the line was used to stretch the images, so all brains have the same size. Finally, the position of the line gave a xyz positional reference. All brains were assumed to be flat landed and have no tilt around the x and y axis of the images.

Atlas development: Fiji software was used to create an atlas of the P7 brain mouse. One brain was chosen, and regions were manually drawn on 50 horizontal slices for most regions except for dorsal, lateral and ventral cortex which were drawn on 30 coronal slices. Matlab software was then used to reconstruct a volumetric atlas using interpolation and process the images.

Three-dimensional image analysis: first, images were segmented with a user defined threshold to separate the brain from the background on a gaussian blurred version of the image ($\sigma_{xy} = 10$ vx). Noise sigma was determined using 16th and 84th percentile of the distribution of voxel values inside the brain (+/− 1 σ). Images were then high pass (subtraction of a gaussian blurred version of the image, $\sigma_{xy} = 6$ vx), and low pass (gaussian blur, $\sigma_{xy} = 1$ vx) filtered. After this process, every voxel with a value above 2 noise sigma was considered a c-caspase-3 positive voxel. Division of positive voxels by total voxels in each region gave the final results, presented in Supplementary file 1.

Two-dimensional image analysis. Fiji software was used for image processing and quantification of immunochemistry staining. Cortical layers were determined on Hoechst-33342 labeled images. General cell counter plugin (https://github.com/ychastagnier/General-Cell-Counter) was used for c-caspase-3 expressing cells quantification (Image pixel size (µm): 0.645, plugin parameters: Threshold method: Auto Local Threshold–Mean, Gaussian high pass sigma (µm): 8, Median filter radius (px): 0, Local Threshold radius (px): 25, Offset: -30, Cell area range (µm²): 15–140, Cell circularity range: 0.1–1.0, Minimal distance (µm): 1). Cells co-expressing the c-caspase-3 with other markers were manually counted. Results are presented in Supplementary file 1.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using Graph Pad Prism software, version 9.5.1 (Graph Pad Software, La Jolla, CA, United States). The normality of distribution of continuous variables was tested by the Shapiro–Wilk test. Two-tailed Mann–Whitney U test was used to compare means of 2 groups of independent variables. Two-tailed Friedman's one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunn test were used to compare the three paired conditions. Alpha = 0.05 for all statistical tests.

Data are presented as median [IQR] except for histological characterization, data are presented as mean [s.d.]. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

Data availability

Raw images are available upon request. Data resulting from image analysis are presented in the supplementary file.

Received: 26 May 2023; Accepted: 31 August 2023
Published online: 07 September 2023

References

1. Shi, Y. *et al.* Epidemiology of general anesthesia prior to age 3 in a population-based birth cohort. *Pediatr. Anesth.* **28**, 513–519 (2018).
2. Ikonomidou, C. *et al.* Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* **283**, 70–74 (1999).
3. Istaphanous, G. K., Ward, C. G. & Loepke, A. W. The impact of the perioperative period on neurocognitive development, with a focus on pharmacological concerns. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* **24**, 433–449 (2010).
4. Gascoigne, D. A., Serdyukova, N. A. & Aksenov, D. P. Early development of the GABaergic system and the associated risks of neonatal anesthesia. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 4–8 (2021).
5. Andropoulos, D. B. Effect of anesthesia on the developing brain: infant and fetus. *Fetal Diagn. Ther.* **43**, 1–11 (2018).
6. US Food and Drug Administration. Drug Safety and Availability—FDA Drug Safety Communication: FDA Review Results in New Warnings about Using General Anesthetics and Sedation Drugs in Young Children and Pregnant Women. (2016).
7. US Food and Drug Administration. FDA Drug Safety Communication: FDA Approves Label Changes for Use of General Anesthetic and Sedation Drugs in Young Children. (2017).
8. Franks, N. P. & Lieb, W. R. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* **367**, (1994).
9. Campagna, J. A., Miller, K. W. & Forman, S. A. Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. *N. Engl. J. Med.* **348**, 2110–2124 (2003).
10. Walters, J. L. & Paule, M. G. Review of preclinical studies on pediatric general anesthesia-induced developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.* **60**, 2–23 (2017).
11. Loepke, A. W. & Soriano, S. G. An assessment of the effects of general anesthetics on developing brain structure and neurocognitive function. *Anesth. Analg.* **106**, 1681–1707 (2008).
12. Aksenov, D. P., Miller, M. J., Dixon, C. J. & Drobyshevsky, A. Impact of anesthesia exposure in early development on learning and sensory functions. *Dev. Psychobiol.* **62**, 559–572 (2021).
13. Yon, J. H., Daniel-Johnson, J., Carter, L. B. & Jevtovic-Todorovic, V. Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Neuroscience* **135**(3), 815–827 (2005).
14. Gutierrez, S. *et al.* Is age-dependent, ketamine-induced apoptosis in the rat somatosensory cortex influenced by temperature?. *Neuroscience* **168**(1), 253–262 (2010).
15. Deng, M. *et al.* Brain regional vulnerability to anaesthesia-induced neuroapoptosis shifts with age at exposure and extends into adulthood for some regions. *Br. J. Anaesth.* **113**, 443–451 (2014).
16. Hofacer, R. D. *et al.* Cell age-specific vulnerability of neurons to anesthetic toxicity. *Ann. Neurol.* **73**, 695–704 (2013).

17. Maloney, S. E. *et al.* Repeated neonatal isoflurane exposures in the mouse induce apoptotic degenerative changes in the brain and relatively mild long-term behavioral deficits. *Sci. Rep.* **9**, 1–14 (2019).
18. Krzisch, M. *et al.* Propofol anesthesia impairs the maturation and survival of adult-born hippocampal neurons. *Anesthesiology* **118**, (2013).
19. Rizzi, S., Ori, C. & Jevtovic-Todorovic, V. Timing versus duration: Determinants of anesthesia-induced developmental apoptosis in the young mammalian brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1199**, 43–51 (2010).
20. Dikranian, K. *et al.* Apoptosis in the in vivo mammalian forebrain. *Neurobiol. Dis.* **8**, 359–379 (2001).
21. Varju, P., Katarova, Z., Madarász, E. & Szabó, G. GABA signalling during development: New data and old questions. *Cell Tissue Res.* **305**, 239–246 (2001).
22. Luján, R., Shigemoto, R. & López-Bendito, G. Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience* **130**, 567–580 (2005).
23. De Lima, A. D., Opitz, T. & Voigt, T. Irreversible loss of a subpopulation of cortical interneurons in the absence of glutamatergic network activity. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 2931–2943 (2004).
24. Zheng, S. Q., An, L. X., Cheng, X. & Wang, Y. J. Sevoflurane causes neuronal apoptosis and adaptability changes of neonatal rats. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **57**, 1167–1174 (2013).
25. Amrock, L. G., Starner, M. L., Murphy, K. L. & Baxter, M. G. Long-term effects of single or multiple neonatal sevoflurane exposures on rat hippocampal ultrastructure. *Anesthesiology* **122**, 87–95 (2015).
26. Cattano, D., Young, C., Straiko, M. M. W. & Olney, J. W. Subanesthetic doses of propofol induce neuroapoptosis in the infant mouse brain. *Anesth. Analg.* **106**, 1712–1714 (2008).
27. Jevtovic-Todorovic, V. *et al.* Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J. Neurosci.* **23**, 876–882 (2003).
28. Zhou, Z. B. *et al.* Subclinical concentrations of sevoflurane reduce oxidative stress but do not prevent hippocampal apoptosis. *Mol. Med. Rep.* **14**, 721–727 (2016).
29. Fredriksson, A., Pontén, E., Gordh, T. & Eriksson, P. Neonatal exposure to a combination of N-Methyl-D-aspartate and γ-aminobutyric acid type A receptor anesthetic agents potentiates apoptotic neurodegeneration and persistent behavioral deficits. *Anesthesiology* **107**, 427–436 (2007).
30. Yu, D., Jiang, Y., Gao, J., Liu, B. & Chen, P. Repeated exposure to propofol potentiates neuroapoptosis and long-term behavioral deficits in neonatal rats. *Neurosci. Lett.* **534**, 41–46 (2013).
31. Walters, J. L. & Paule, M. G. Review of preclinical studies on pediatric general anesthesia-induced developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol Teratol* https://doi.org/10.1016/j.ntt.2016.11.005 (2016).
32. Zhou, Z. W. W. *et al.* The glutaminergic, GABAergic, dopaminergic but not cholinergic neurons are susceptible to anaesthesia-induced cell death in the rat developing brain. *Neuroscience* **174**, 64–70 (2011).
33. Creeley, C. E. *et al.* Isoflurane-induced apoptosis of neurons and oligodendrocytes in the fetal rhesus macaque brain. *Anesthesiology* **120**, 626–638 (2014).
34. Brambrink, A. M. *et al.* Isoflurane-induced apoptosis of oligodendrocytes in the neonatal primate brain. *Ann. Neurol.* **72**, 525–535 (2012).
35. Noguchi, K. K. *et al.* Isoflurane exposure for three hours triggers apoptotic cell death in neonatal macaque brain. *BJA Br. J. Anaesth.* **119**, 524–531 (2017).
36. Rizzi, S., Carter, L. B., Ori, C. & Jevtovic-Todorovic, V. Clinical anesthesia causes permanent damage to the fetal guinea pig brain. *Brain Pathol.* **18**, 198–210 (2008).
37. Slikker, W. *et al.* Ketamine-induced neuronal cell death in the perinatal rhesus monkey. *Toxicol. Sci.* **98**, 145–158 (2007).
38. Liang, G. *et al.* Isoflurane causes greater neurodegeneration than an equivalent exposure of sevoflurane in the developing brain of neonatal mice. *Anesthesiology* **112**, 1325–1334 (2010).
39. Oppenheim, R. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* **14**, 453–501 (1991).
40. Wong, F. K. & Marín, O. Developmental cell death in the cerebral cortex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **35**, 523–542 (2019).
41. Rice, D. & Barone, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.* **108**, 511–533 (2000).
42. Blanquie, O. *et al.* Electrical activity controls area-specific expression of neuronal apoptosis in the mouse developing cerebral cortex. *Elife* **6**, e27696 (2017).
43. Wang, Q. *et al.* Ketamine-induced apoptosis in the mouse cerebral cortex follows similar characteristic of physiological apoptosis and can be regulated by neuronal activity. *Mol. Brain* **10**, 24 (2017).
44. Wang, Q., Li, Y., Tan, H. & Wang, Y. Sevoflurane-Induced Apoptosis in the Mouse Cerebral Cortex Follows Similar Characteristics of Physiological Apoptosis. *Front. Mol. Neurosci.* **15**, 873658 (2022).
45. Creeley, C. E. From drug-induced developmental neuroapoptosis to pediatric anesthetic neurotoxicity—where are we now?. *Brain Sci.* **6**(3), 32 (2016).
46. Nikolić, M., Gardner, H. A. R. & Tucker, K. L. Postnatal neuronal apoptosis in the cerebral cortex: Physiological and pathophysiological mechanisms. *Neuroscience* **254**, 369–378 (2013).
47. Chai, D., Yan, J., Li, C., Sun, Y. & Jiang, H. Sevoflurane inhibits neuronal migration and axon growth in the developing mouse cerebral cortex. *Aging* **12**, 6436–6455 (2020).
48. Istaphanous, G. K. *et al.* Characterization and quantification of isoflurane-induced developmental apoptotic cell death in mouse cerebral cortex. *Anesth. Analg.* **116**, 845–854 (2013).
49. Zanghi, C. N., Jevtovic-todorovic, V. & Campus, A. M. A Holistic Approach to Anesthesia-Induced Neurotoxicity and its Implications for Future Mechanistic Studies. *Neurotoxicol Teratol* **60**, 24–32. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2016.12.004.A (2018).
50. Salik, I. Anesthetic Neurotoxicity in Children. *Med. Res. Arch.* **10**, (2022).
51. Ma, L. H., Yan, J., Jiao, X. H., Zhou, C. H. & Wu, Y. Q. The Role of Epigenetic Modifications in Neurotoxicity Induced by Neonatal General Anesthesia. *Front. Mol. Neurosci.* **15**, (2022).
52. Yamamoto, H. *et al.* Transcriptome analysis of sevoflurane exposure effects at the different brain regions. *PLoS ONE* **15**, e0236771 (2020).
53. Zhao, X.-P. *et al.* Early-life sevoflurane exposure impairs fear memory by suppressing extracellular signal-regulated kinase signaling in the bed nucleus of stria terminalis GABAergic neurons. *Neuropharmacology* **191**, 108584 (2021).
54. Ji, M.-H. *et al.* Pre-administration of curcumin prevents neonatal sevoflurane exposure-induced neurobehavioral abnormalities in mice. *Neurotoxicology* **46**, 155–164 (2015).
55. Satomoto, M. *et al.* Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fear conditioning in mice. *Anesthesiology* **110**, 628–637 (2009).
56. Renier, N. *et al.* iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* **159**, 896–910 (2014).

Acknowledgements
We would like to thank the RAM-iExplore animal, IBENS imaging and MRI imaging facilities. We also thank Gaspard Gerschenfeld and Jonathan Bradley for invaluable advice on tissue clearing, immunostaining and imaging.

Author contributions
JP and VS designed the experiments. JA, CS, JP, NB and VS conducted the experiments. YC developed the analysis softwares. JA and CS analyzed the data. CS and VS wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Competing interests
The authors declare no competing interests.

Additional information
Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1038/s41598-023-41750-w.

Correspondence and requests for materials should be addressed to V.S.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2023

Retour au texte

ANNEXE 2 : PROTOCOLE I-DISCO+ (2)

SÉVOFLURANE – DEXMÉDÉTOMIDINE SUR CERVEAUX ENTIERS P7



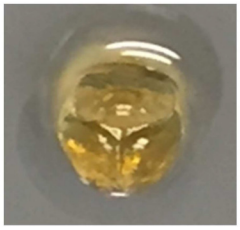
Anesthésie Sévoflurane

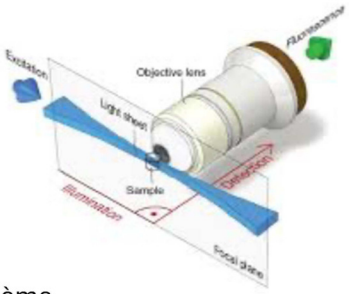


Injection intrapéritonéale de dexmédétomidine

- **Contrôle**
  - Oxygène n=3
  - Anticorps II aire n=3
- **Sévoflurane**
  - Sévo 3% n=3
  - Sévo 2% n=3
- **Sévoflurane + Dexmédétomidine**
  - Sévo 3% + Dexméd n=3
  - Sévo 2% + Dexméd n=3

Méthodologie i-DISCO+

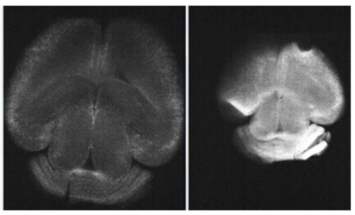


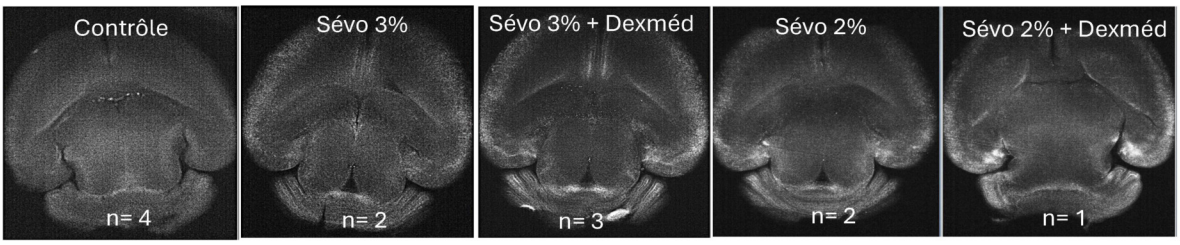


Echec de transparisation



Problème de réhydratation

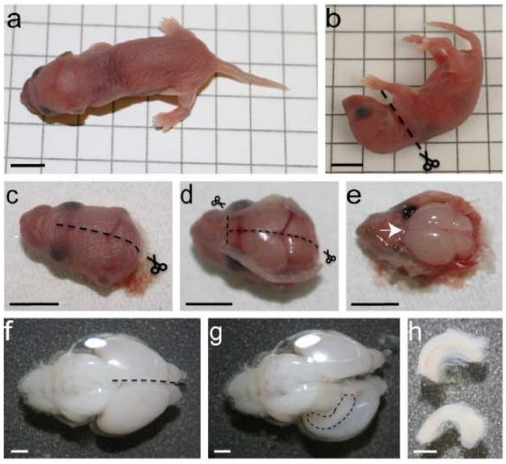


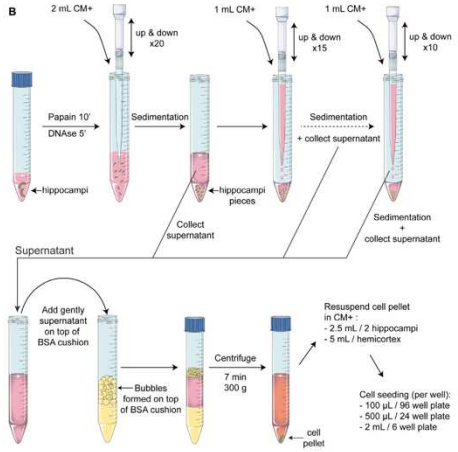


Retour au texte

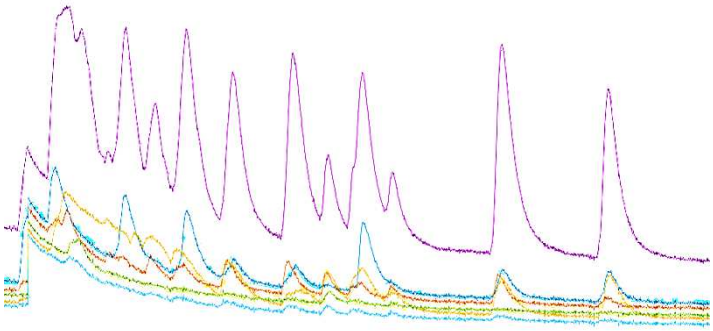
ANNEXE 3 : IMAGERIE DE BIOSENSEURS SUR CULTURES PRIMAIRES DE NEURONES

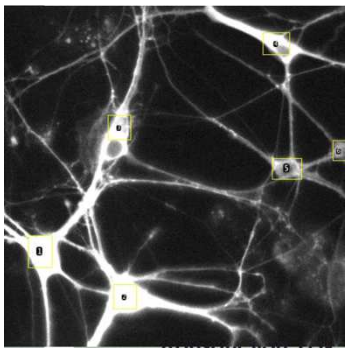
A. Vue d'ensemble du protocole de réalisations de culture de neurone d'hippocampe postnatal de souris (modèle développé par l'équipe [237])





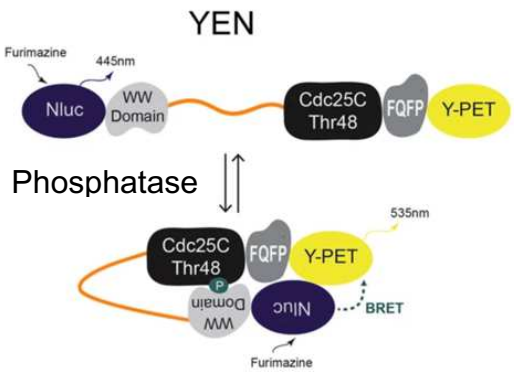
B. Imagerie calcique – Senseur Calcique GCaMP6



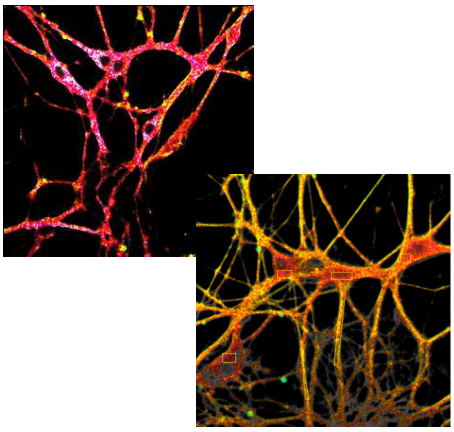


C. Transfert d'énergie bioluminescente par résonance (BRET)

Rapporteur ERK – YEN (rapporteur développé par l'équipe [238])



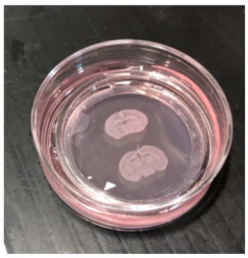
Le changement de conformation induit par la phosphorylation de YEN augmente la proximité entre Nluc et Y-PET, ce qui favorise l'augmentation de BRET.

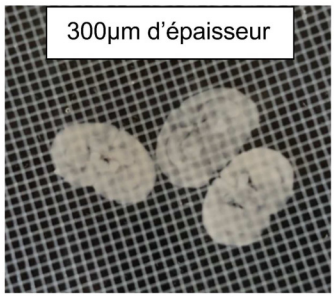


Retour au texte

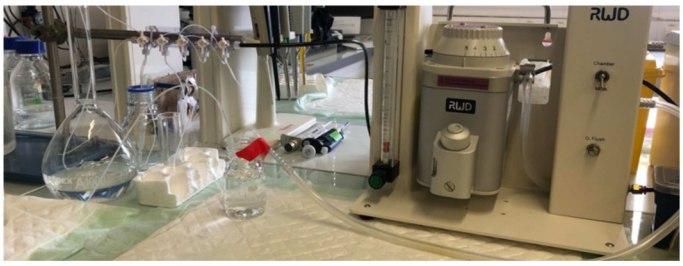
ANNEXE 4 : IMAGERIE DE BIOSENSEURS SUR TRANCHE DE CERVEAUX

A. Tranches de cerveaux de souriceaux

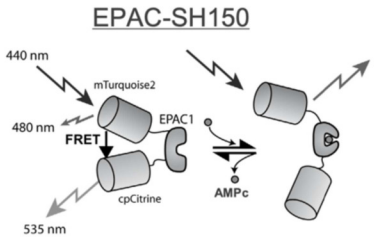




B. Mélange Isoflurane 5% et carbogène mis en bullage pour permettre l'exposition des tranches sur le poste d'imagerie.

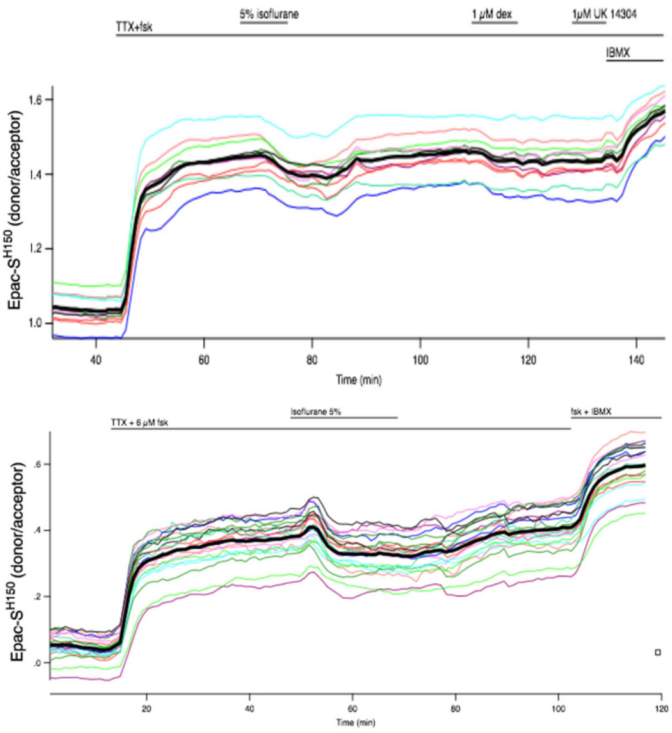


C. Biosenseurs EpacS^{H150} FRET - AMPc [239]

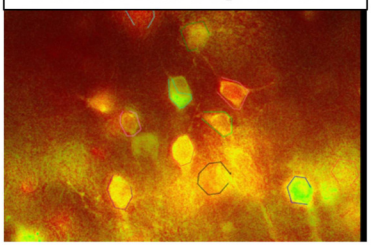


La fixation d'une molécule d'AMPc au domaine senseur de la sonde EpacS^{H150} occasionne l'éloignement des deux fluorophores, et une diminution du transfert d'énergie entre les deux fluorophores

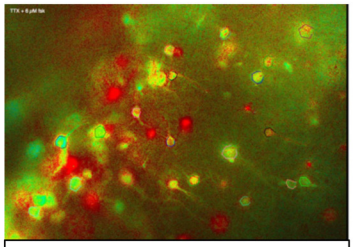
D. Effet de l'isoflurane et la dexmédétomidine sur les variations d'AMPc



Cortex retrosplenial



- Fsx : forskoline : activateur de l'adénylate cyclase.
- UK 14304 : Agoniste des récepteurs α 2 -adrénergiques
- IBMX : Augmente les niveaux d'AMPc intracellulaire par inhibition puissante et non spécifique de la phosphodiestérase



Cortex visuel

Retour au texte