



**HAL**  
open science

# Quelles potentialités thérapeutiques pour l'érythropoïétine recombinante dans le traitement des traumatismes du système nerveux central ?

Thomas Lieutaud

► **To cite this version:**

Thomas Lieutaud. Quelles potentialités thérapeutiques pour l'érythropoïétine recombinante dans le traitement des traumatismes du système nerveux central ?. Neurobiologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT: . tel-00670526v1

**HAL Id: tel-00670526**

**<https://theses.hal.science/tel-00670526v1>**

Submitted on 15 Feb 2012 (v1), last revised 2 Jun 2016 (v2)

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° d'ordre  
Année 2012

THÈSE présentée

devant L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1  
Pour l'obtention du DIPLOME DE DOCTORAT  
(arrêté du 7 août 2006)

Présentée et soutenue publiquement le 1<sup>er</sup> février 2012 par

**Thomas LIEUTAUD**

TITRE :

**Quelles potentialités thérapeutiques pour l'érythropoïétine  
recombinante dans le traitement des traumatismes du  
système nerveux central ?**

Directeur de thèse : Dr Laurent BEZIN

JURY :

Pr Etienne JAVOUHEY,	Président
Docteur Aram TER MINASSIAN,	Rapporteur
Pr François SZTARK,	Rapporteur
Pr Patrick LEVY	Examineur
Dr Stephane MARINESCO	Examineur
Dr Jean-Jacques RISSO	Examineurs

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Secrétaire Général

**M. A. Bonmartin**

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. le Professeur J-F. Mornex

M. G. Gay

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. Farge

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. De Marchi

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. Fleury

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Département GEP

Directeur : M. N. Siauve

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Département Physique

Directeur : Mme S. Fleck

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme le Professeur I. Daniel

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. Collignon

Observatoire de Lyon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Directeur : M. P. Fournier

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. Pignault

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. R. Bernard

## ***Remerciements,***

A vous, membres de ce jury, présidents, rapporteurs, examinateurs, Etienne Javouhey, Patrick Levy, Francois Sztark, Aram Ter Minassian, Stéphane Marinesco et Jean-Jacques Risso, merci d'avoir accepté de venir faire progresser tant ce travail, que les chemins de recherche que j'ai tenté de baliser depuis toutes ces années. J'espère que ce moment est le prélude ou la continuité vers d'autres collaborations, itinéraires et moments originaux partagés.

A Laurent Bezin, et toutes l'équipe de l'UMR, Chantal, Béatrice, Colette, Marion, Emmanuelle, Amor, Michael, Emilie, Hayet, Rafat, Pascal, Jacques, Frédérique, Anne, vous avez su accueillir un électron libre aux multiples contraintes dans un laboratoire en reconfiguration. Ce fut pour moi passionnant, et j'espère que nous aurons encore beaucoup à chercher ensemble

A Peter Andrews, il ne manque plus qu'Eagle Ridge... A Françoise, au travers du monde

A Amina et Mireille, sans qui ce travail sonnerait creux et certaines explications encore en attente, tout comme à Jean-Baptiste et Denis par qui l'IRM est devenue plus accessible,

A Bernard Renaud, dans la suite des projets de microdialyse et de neurosciences, je te devais bien cela ; à tous les membres de la plateforme, de l'UMR 648 ou de la neurochimie avec qui nous avons échangé très amicalement

A mes confrères Romain, Rachid, et Lionel, qui ont pris le risque de croire à ce projet « traumatisme crânien expérimental ». Cela n'a pas été tous les jours faciles, mais, toujours avec plaisir, nous avons avancé dans des terrains incertains. A tous mes autres collègues et amis de l'hôpital neurologique ou de Lyon Sud, Mathilde, Jean-Charles, Edmundo, Sébastien, Caroline, Florent, Christine, Jean-Stéphane, Nicolas, Laurent, Frédéric, et tous les autres qui ont compris, ou pas, ma démarche. Sans vous je n'aurais pas pu mener à bien ce travail. A la mémoire d'Alain Edouard, et de Christine d'Herrouville, c'était le début d'une histoire. A Yves Veillette, même sans se voir, je n'oublie pas mes premiers pas

Aux tous les infirmiers et infirmières, IADE ou non, aides soignants, kinésithérapeutes, secrétaires et petits personnels de l'hôpital qui jalonnent les échanges avec les malades de leurs mains et leurs sourires indispensables. Sans eux, tout cela n'aurait pas la même saveur

A mes parents qui ont cru il y a si longtemps que je parviendrai à quelque chose dans le système scolaire au moment où l'alpinisme développait un pouvoir d'attraction presque exclusif et salvateur ; à ceux avec qui je partage un espace de montagne qui nous rappelle la taille de l'homme face au monde ; A Michel avec qui, penser a commencé et Luc, avec qui ça s'est poursuivi

Marion, Mathias et Gaspard, j'ai tant appris de vous. Même loin de vos préoccupations actuelles, je vous dédie ce travail

Anne Cécile, les mots ne suffiront pas, il y a tant à dire et à taire, à imaginer et à créer encore, à dessiner, souffler et rire, soutenir et exprimer, en faisant bouger des lignes cachées, imprévisibles, humaines, tous ces tatonnements et bonheurs qui nouent cette vie avec toi

« Ceux qui travaillent sont plus grands que leur tâches, au risque de s'y abîmer. »

Yves Clot *Le Travail à Coeur*

« Appartenir à la classe dominante, c'est d'abord être convaincu qu'on peut transgresser la lettre de la règle, sans en trahir l'esprit »

Luc Boltanski *De la Justification*

« Le vivant, chaque fois, existe dans et par une clotûre. Nous n'entrons pas dans le vivant, nous pouvons lui cogner dessus, lui imposer des chocs, mais de toute façon, il réagira à sa façon. »

Cornelius Castoriadis *Le Monde Morcelé*

« Penser, n'est pas sortir de la caverne, ni remplacer l'incertitude par les contours tranchés des choses mêmes, la lueur vacillante d'une flamme par la lumière d'un vrai soleil. C'est entrer dans un Labyrinthe, plus exactement, faire être et apparaître un Labyrinthe. C'est se perdre dans les galeries que nous creusons inlassablement. »

Cornelius Castoriadis *Les carrefours du Labyrinthe*

# **Quelles potentialités thérapeutiques pour l'érythropoïétine recombinante dans le traitement des traumatismes du système nerveux central ?**

*De la moelle épinière au cerveau, de l'homme à l'animal, des phases cliniques aux phases précliniques, itinéraires de recherche d'une molécule potentiellement neuroprotectrice*

# TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION OU BREVE HISTOIRE D'UNE LECTURE AUX CONSEQUENCES INSOUÇONNEES .....	14
<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES SUR L'ERYTHROPOIETINE.....</b>	<b>19</b>
2. L'ERYTHROPOIETINE: D'UNE HORMONE HEMATOPOIETIQUE A UNE THERAPEUTIQUE NEUROPROTECTRICE .....	19
2.1. Erythropoietine (Epo) : action hormonale, autocrine et paracrine sous la dépendance de l'hypoxie ; synthèse et mécanisme d'action	19
2.2. Le récepteur de l'Erythropoïétine : un récepteur transmembranaire couplé à JAK-2	20
2.3. L'Epo et l'EpoR indispensables à l'embryogénèse	21
2.4. Variations des concentrations d'Epo en situation pathologiques chez l'homme	22
2.4.1. Chez le nouveau-né et l'enfant	22
2.4.2. Hémorragie sous arachnoïdienne	22
2.4.3. En réanimation	22
2.5. Utilisations thérapeutiques de l'Epo recombinante humaine (Epo-rh)	23
2.5.1. Epo de synthèse	23
2.5.2. Les indications validées : actions hématopoïétiques	23
2.5.3. Actions non hématopoïétiques	24
2.5.4. Efficacité neurocomportementale de l'Epo-rh sur les modèles animaux	31
2.5.5. Pharmacologie, fenêtre thérapeutique, dose efficace	38
2.5.6. Chez l'homme	39
<b>ETUDES 1 ET 2 : TMD CHEZ L'HOMME .....</b>	<b>44</b>
3. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES TRAUMATISMES MEDULLAIRES DEFICITAIRES CHEZ L'HOMME .....	44
3.1. Quelques données préliminaires sur le TMD chez l'homme	44
3.1.1. Neuroprotection pharmacologique dans le traumatisme médullaire chez l'homme : controverse autour des glucocorticoïdes à fortes doses	44
3.1.2. Le traumatisme médullaire en quelques chiffres	45
3.1.3. Physiopathologie du traumatisme médullaire	46
3.2. Neuroprotection pharmacologique dans le traumatisme médullaire chez l'homme :	48
3.2.1. Evaluation de la gravité du traumatisme médullaire	48
3.2.2. Prise en charge	48
3.2.3. Les moyens pharmacologiques	49
4. EFFETS DE L'EPO DANS LE TRAUMATISME MEDULLAIRE ? NOS ETUDES 1 ET 2.....	51
4.1. Présentation de l'étude TETRAM	51
4.2. Notre travail	52
4.2.1. Epidémiologie du traumatisme médullaire (étude 1)	52
4.2.2. Evolution de l'incidence de la traumatologie médullaire (Etude 2)	61
<b>ETUDE 3 ET 4 : EFFETS DE L'EPO-RH DANS LE TRAUMATISME CRANIEN. RATIONNEL CHEZ L'HOMME ET ETUDES PRECLINIQUES CHEZ L'ANIMAL .....</b>	<b>92</b>
5. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES : TRAUMATISMES CRANIENS CHEZ L'HOMME .....	92
5.1. Définition d'un traumatisme crânien (TC)	92
5.2. Epidémiologie	95
5.3. Evaluation de la gravité du Traumatisme Crânien	97

5.4.	Les méthodes d'évaluation non clinique de la gravité d'un traumatisme crânien	97
5.4.1.	Scanner cérébral	98
5.4.2.	L'IRM cérébrale classique, l'IRM en tenseur de diffusion, l'IRM fonctionnelle	99
5.4.3.	Résultats chez l'homme	106
5.4.4.	Autres modalités d'IRM	109
5.5.	Séquelles neurologiques	110
5.5.1.	Mesure des séquelles	110
5.5.2.	Mortalité	111
5.5.3.	Epilepsie ou Post traumatic seizure (PTS)	112
5.5.4.	Déficits sensitivo-moteurs et neuropsychologiques, handicaps	113
5.5.5.	Les troubles cognitifs	113
5.5.6.	Troubles psychiatriques	114
5.5.7.	Perception de la santé, perte de travail ou de lien social	116
5.6.	Traitements et prévention	116
5.6.1.	Prévention primaire : diminuer l'incidence du TC	117
5.6.2.	La prévention secondaire : Réduire la gravité immédiate du TC lorsqu'il y a TC	117
5.6.3.	Prévention tertiaire : Améliorer la prise en charge du TC par des actions de formation	120
6.	RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES : TRAUMATISMES CRANIENS EXPERIMENTAUX...	122
6.1.	Les différents modèles expérimentaux de traumatisme crânien	122
6.1.1.	<i>Traumatisme crânien à boîte crânienne fermée (CHI : Controlled head injury ou Impact Acceleration Model)</i>	122
6.1.2.	Traumatisme crânien à boîte crânienne ouverte	124
6.2.	Evaluation de la gravité du TC expérimental	127
6.3.	Mesures des effets du TC expérimental	128
6.3.1.	Mortalité immédiate	128
6.3.2.	Effets comportementaux	129
6.3.3.	Effets de l'Epo-rh sur les troubles cognitifs après TC	137
7.	ETUDE 3 ET 4 : NOS TRAVAUX PRECLINIQUES .....	145
7.1.	Evaluations des effets cérébraux d'un LFPI (1,6-1,8 atm) : Etude 3	145
7.1.1.	Tests neurocomportementaux	146
7.2.	Résultats histologiques	153
7.2.1.	Préparation du tissu cérébral pour l'histologie, immunomarquages	153
7.2.2.	Comptes neuronaux	153
7.2.3.	Réponse inflammatoire	155
7.2.4.	Réponse du système Epoergique	161
7.2.5.	Réponse IRM-DTI	162
7.3.	Effets de l'Epo-rh sur la réponse inflammatoire génique et protéique après LFPI (Etude 3 et 4)	165
8.	CONCLUSION.....	177
9.	ANNEXES.....	183
9.1.	Annexes 1 Etude TETRAM	183
9.2.	Annexes histologie	184
9.3.	Annexe 3 : RT-PCR	186
9.4.	Acquisition des données en IRM	189
10.	BIBLIOGRAPHIE.....	193

## Résumé

**Situation du sujet :** L'érythropoïétine (Epo) est une protéine ubiquitaire dans les tissus de l'organisme. Elle est dotée d'une fonction endocrine, autocrine et paracrine. Elle favorise les activités anti-apoptotiques des tissus soumis à un stress hypoxique. Dans de nombreux modèles animaux de traumatisme ou d'agression du système nerveux central et quelques études cliniques, l'Epo recombinante humaine (Epo-rh) a révélé des propriétés neuroprotectrices. L'objectif principal de ce travail est d'améliorer les connaissances sur l'Epo afin de favoriser l'inclusion de l'Epo-rh dans l'arsenal thérapeutique chez l'homme après traumatisme du système nerveux central.

**Matériel et méthodes :** Deux axes de travail ont été explorés : dans une première partie, pour expliquer l'échec de la mise en œuvre d'une étude de la tolérance et d'efficacité biologique de l'Epo-rh dans le Traumatisme Médullaire Déficitaire (TMD) chez l'homme, nous avons étudié l'épidémiologie des TMD sur la période 1997-2006, à partir du Registre des accidents du Rhône. Ensuite nous avons étudié l'évolution de cette incidence entre 2 périodes de 6 ans : 1995-2001 et 2003-2008. Parallèlement, compte tenu d'une incidence de traumatisme crânien (TC) 20 fois plus élevée que celle du TMD chez l'homme, nous avons entrepris de caractériser les effets d'un TC expérimental par percussion fluide latérale (LFPI) chez le rat afin de mieux comprendre la pharmacologie et les mécanismes d'action moléculaires, en particulier anti-inflammatoires et neuroprotecteurs, de l'Epo-rh.

**Résultats :** Nous avons montré que l'incidence du TMD était d'environ 5/100 000 habitants. Néanmoins, près de 40% des TMD décédaient dans les premières heures suivant l'accident, souvent avant l'arrivée des secours. D'autre part, cette incidence correspondait à une inclusion potentielle de 57 TMD isolés sur 7 ans. L'évolution de l'incidence des TMD ne changeait pas au cours de la période récente alors que l'accidentologie grave s'effondrait de 33%. Dans la période récente, les victimes de TMD étaient plus souvent polytraumatisées, motocyclistes et plus âgées avec une augmentation non significative de la mortalité de 17%. Parallèlement, un LFPI de 1,6-1,8 atm induit des modifications histologiques et en expression génique mais est sans effet sur le comportement ou sur les paramètres mesurés en IRM-DTI au niveau du corps calleux ou du thalamus dorsal. Si l'Epo-rh diminue les concentrations d'IL-1 $\beta$  et de MIP-2 au niveau du cortex traumatisé, elle est sans effet sur l'augmentation des transcrits de l'IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et IL-6. Elle est également sans action sur l'expression des transcrits de l'Epo et de son récepteur (EpoR). L'Epo-rh a une biodisponibilité à 4h équivalente entre les voies intrapéritonéale et intraveineuse, et se concentre plus facilement dans le cerveau du côté traumatisé ou elle reste détectable pendant 24h.

**Conclusion** : Il sera difficile d'inclure des patients dans un contexte de TMD sans autre lésion associée compte tenu de l'évolution de l'incidence du TMD dans la principale population cible à Lyon. Un LFPI de 1,6-1,8 atm n'induit pas de troubles neurocomportementaux ni de signaux IRM détectables en DTI. Ce LFPI génère une perte neuronale au niveau du cortex pariéto-temporal et de l'hippocampe correspondant à des signes évoquant un TC mineur. L'Epo-rh passe la barrière hémoméningée plus facilement du côté traumatisé, réduit les concentrations d'IL-1 $\beta$  et de MIP-2 mais est sans action d'une part sur les transcrits de ces molécules inflammatoires et d'autre part sur les transcrits de l'Epo et de l'Epo-R, pour ce niveau de traumatisme.

**Mots Clés** :

traumatisme médullaire déficitaire, Traumatisme crânien, traumatisme expérimental, inflammation, comportement, IRM-Tenseur diffusion, épidémiologie

# **Which therapeutic potencies for recombinant human erythropoietin in central nervous system traumatic injuries ?**

Abstract

## **Background**

Erythropoietin (Epo) is an ubiquitous cytokine. It has endocrine, paracrin and autocrin functions. It improves antiapoptotic mechanisms on all tissues subjected to hypoxic stress. In many animal models of brain trauma but also in other brain injury models, and some human clinical studies, recombinant Human Epo (Epo-rh) has proven neuro-protective properties. The main goal of this work was to improve and incorporate Epo-rh in the pharmacological arsenal of treatment in brain and spinal cord traumatic injuries in human.

## **Material and methods**

In a first part, to explore the reasons of failure of inclusion in a Spinal Cord Injury (SCI) study to test the thrombo-embolic tolerance and efficacy of Epo-rh, we studied the epidemiology of SCI using the road crash Rhône registry in the period 1997-2006. Then we compared the epidemiological trends of the SCI incidence, associated trauma, mortality and fatality rates in two periods of 6 years: 1995-2001 and 2003-2008. In a second part, due to the 20-fold higher incidence of traumatic brain injury (TBI) in comparison to SCI, we characterized the effects of a moderate (1.6-1.8 atm) lateral fluid percussion injury (LFPI) in order to understand and characterize the pharmacological, antiinflammatory and neuroprotective mechanisms of action of Epo-rh in such a brain injury.

## **Results :**

The incidence of SCI was 5/100 000 inhabitants in the Rhône area during the 10 year period. However, 40% of the patients died before or immediately after arriving in hospital facility. This means that, in the 10 years studied, only 57 patients with SCI without associated lesions could be included in the study. Although incidence of severe road crash trauma decreased by 33%, no change in the SCI incidence was observed in the later 6-year period. SCI victims were significantly more aged, polytraumatized, and more frequently using motorcycle, despite mortality increased, non significantly, by 17%.

In the experimental LFPI model, we noted histological and genic modifications without significant changes in behavior and MRI-DTI data obtained in the dorsum thalamus and the corpus callosum. If Epo-rh decreased IL-1 $\beta$  and MIP-2 protein concentrations in the cortex, it had no effect either on the 15- to 50-fold increase of the transcripts of IL-1 $\beta$  , TNF $\alpha$  and IL-6 or on the Epo and EpoR genic responses whatever the brain structures analyzed ipsilaterally

to the trauma. Bioavailability of Epo-rh in the traumatic cortex was significant 4 hours after intraperitoneal or intravenous injection using at least 3000 UI/kg, was increased in the trauma side and remained elevated for 24h while it disappeared in the non trauma side.

**Conclusion** : it should be difficult to include SCI patients without associated body lesions in Lyon due to the change of the incidence of the main target population. Experimental LFPI of 1.6-1.8 atm corresponds to a mild brain trauma because neither behavioral changes nor MRI-DTI modifications were observed. Such a LFPI induced i) neuronal loss and astroglial reaction in the ipsilateral side, ii) an increase in the inflammatory protein concentrations and associated transcripts, and iii) an increase in Epo and EpoR transcripts. Epo-rh crossed easier the Blood Brain Barrier in the itraumatized side, decreased the IL-1 $\beta$  and MIP-2 protein concentrations in the cortex and had no effect on associated mRNA levels and on Epo system reactivity.

### **Key words**

Spinal cord injury, Brain trauma, lateral fluid percussion injury, experimental, inflammation, behavior, MRI DTI diffusion tensor imaging, epidemiology, road crash.

## Liste des abréviations

ADC : Coefficient apparent de diffusion de l'eau  
AIS : Abbreviated Injury Scale  
ASIA : American Spinal Injury Association  
CCI : Traumatisme crânien par percussion contrôlée ; Controled Cortical Injury  
CHI : traumatisme crânien à boîte crânienne fermée ; Closed Head Injury  
DSC : débit sanguin cérébral  
DTI : Imagerie par analyse des Tenseurs de diffusion  
EIG : Evénement Indésirable Grave  
EP : Embolie Pulmonaire  
Epo : Erythropoïétine  
Epo-rh : Erythropoïétine recombinante humaine  
EpoR : Récepteur à l'érythropoïétine  
FA : Fraction d'anisotropie  
FFT : foot fault test ou test d'erreur de positionnement de pattes  
FIM : Mesure d'indépendance Fonctionnelle  
GCS : Glasgow Coma Scale  
GOS : Glasgow Outcome Score  
Hip : Hippocampe  
ICAM : Intercellular-adhesive Molecule  
IL-10 : Interleukine 10  
IL-1 $\beta$  : Interleukine 1  $\beta$   
IL-6 : Interleukine-6  
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique nucléaire  
LFPI : traumatisme crânien par percussion fluide latérale ; Lateral Fluid Percussion Injury  
MIP-2 : Macrophage Inhibitory Protein-2  
mNNS : Scores neurologiques composites  
MTE : Maladie Thrombo-embolique  
MWM : Test d'apprentissage de la piscine de Morris  
NA : Non Applicable ou non renseigné  
Ncx : Néocortex  
PIC : pression intra-crânienne  
PL : Ponction lombaire  
PtO<sub>2</sub> : Pression tissulaire cérébrale en oxygène  
RCP : Résumé des caractéristiques du produit  
SCI : Spinal Cord Injury  
SF36 : Questionnaire de santé  
T2 : Séquence IRM pondérée en T2  
TDM : Scanner  
ThalD : Thalamus dorsal  
TMD : Traumatisme Médullaire Déficitaire  
TNF $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
TVP : Thrombose Veineuse Profonde  
WD : Traumatisme crânien ou médullaire par chute d'un poids sur la dure mère  
WET : test d'exploration aquatique ; Water Exploration Test

## **1. INTRODUCTION OU BREVE HISTOIRE D'UNE LECTURE AUX CONSEQUENCES INSOUÇONNEES**

---

Tout a commencé un jour de 2002, au bloc opératoire, au cours d'une des nombreuses interventions chirurgicales dont on ne voit jamais la fin, et qui mérite d'autres occupations intellectuelles que le balancier du pas lent de l'anesthésiste, entre machines de ventilation et écrans de surveillance d'un côté et le champ opératoire avec son neurochirurgien concentré et tendu de l'autre. Au fond d'un tiroir, j'ouvrai un numéro récent d'un quelconque journal médical, le feuilletait négligemment, entre publicités toujours tapageuses dont on sourit devant une telle débauche financière et intellectuelle pour la vente de quelques molécules aux effets indésirables jamais vantés, et les articles de propagandes aux divers objectifs qu'il faut chercher entre les lignes. Quelques compte rendus de lecture et surprise...

Ayant pris en charge dans les quelques jours qui précédaient plusieurs patients traumatisés médullaires déficitaires tétra ou paraplégiques (TMD), j'avais été amené à constater l'absence de perspectives pharmacologiques dans la prise en charge de ces patients. Je trouvais pourtant au fond du bloc opératoire de l'hôpital neurologique de nouvelles raisons d'espérer proposer un traitement pharmacologique à des patients dont il est aisé de penser que la rupture de vie induite par ce traumatisme majeur méritait qu'on se penche sur toute piste susceptible d'améliorer même un minimum leur qualité de vie.

L'Epo ou érythropoïétine et le professeur Gorio (2002) ouvraient de nouvelles potentialités.

Dans ce compte rendu de lecture du PNAS, les auteurs faisaient état de récupérations remarquables dans la prise en charge de différents modèles de traumatisme médullaire à l'aide de doses croissantes d'érythropoïétine recombinante humaine (Epo-rh) chez les rats. Ceci confirmait les résultats obtenus avec l'Epo-rh par d'autres auteurs dans d'autres modèles d'agressions cérébrales, ischémiques, épileptiques, neurogénératives, auto-immune ou traumatiques au niveau de l'encéphale. Il apparaissait un champ de recherche et d'application en clinique au service de patients, auxquels aucune stratégie pharmacologique n'était actuellement proposée, à l'hôpital neurologique de Lyon, établissement spécialisé et plus gros hôpital de ce type en Europe.

J'eus donc tendance à vouloir passer rapidement de l'animal à l'homme et après avoir défriché et imaginé un premier, puis deuxième puis troisième protocole, qui m'amenaient à rencontrer tant les neurochirurgiens (Gilles Perrin), les médecins du centre d'investigations cliniques (Catherine Cornu), les collègues d'anesthésie réanimation et du SAMU de Lyon, des centres de rééducation fonctionnelle (Jacques Luauté, Dominique Boisson) et biostatisticiens (Muriel Rabilloud), je déposais un dossier de demande de financement pour un PHRC régional d'abord puis national. Après un premier échec, une seconde sanction négative à un PHRC national tombait malgré l'accord de nombreux centres français pour participer à une étude multicentrique française sur l'efficacité de l'Epo-rh sur la récupération après traumatisme médullaire déficitaire.

Tournant ces difficultés de financement, je contactais les laboratoires distribuant l'Epo-rh en France. L'un des directeurs de recherche trouva l'idée originale et malgré différentes péripéties internes aux reconfigurations économiques des géants de l'industrie pharmaceutique et la disparition de mon interlocuteur des organigrammes de cette société, mon dossier finira par obtenir un financement pour une étude focalisée sur le risque thrombo-embolique induit par l'Epo-rh, étude appelée TETRAM (Traitement par Epo-rh des TRAmatisés Médullaires) qui a été postée sur [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov). Cette étude n'était plus une étude d'efficacité mais une étude de tolérance. En effet, à ce moment, un mauvais vent soufflait sur les Epo-rh quant à leur rôle pro-thrombogène (Coleman 2006) et procarcinogène (Henké 2003). Cependant, le risque pro-carcinogène n'étant retrouvé à cette époque que dans le traitement des tumeurs solides, il ne concernait pas notre population cible. Par contre, le risque thrombo-embolique ne devait pas être négligé car les patients traumatisés médullaires ont un risque de phlébite de 60%, un risque d'embolie pulmonaire de 15% (SCITI, Merli 2003). Et puis, il n'existait alors, aucune étude sérieuse sur la relation effet dose pour la neuroprotection chez l'homme. Nous avons donc proposé de réaliser une étude de tolérance, en évaluant le risque d'embolie pulmonaire induit par l'Epo-rh, selon une procédure d'administration bayésienne, chez les patients avec un traumatisme médullaire déficitaire (TMD) (annexe 1 pour le résumé synoptique).

Après l'obtention de l'accord de l'AFSAPPS, aucun patient n'a pu être inclus dans les 9 mois suivant l'ouverture de l'étude. Le laboratoire, compte tenu des incertitudes pesant sur le produit, a préféré retirer son soutien tout comme ce laboratoire l'a fait presque dans les mêmes temps à d'autres investigateurs (Wilson 2007). Grâce à Amina Ndiaye et Mireille

Chiron de l'INRETS, nous avons pu montrer les raisons épidémiologiques de l'absence d'inclusion des patients, raisons que nous avons détaillées dans 2 articles (articles 1 et 2).

Parallèlement, pour promouvoir l'étude de l'Epo-rh mais aussi d'autres produits potentiellement neuroprotecteurs, il était nécessaire de favoriser le développement de la recherche fondamentale sur le sujet. Il existait déjà un laboratoire spécialisé dans l'étude de la traumatologie médullaire expérimentale, chez Alain Privat à Montpellier que j'avais contacté au moment de l'élaboration de TETRAM. Mais surtout, à cette époque (2004-2005), aucune équipe française ne publiait sur le traumatisme crânien expérimental. Il semblait donc possible de développer cette thématique qui pourrait plus facilement être exportable chez l'homme, l'incidence du TC grave après accident de la route étant 20 fois plus élevée que celle du TMD (Javouhey 2006). Je reprenais alors contact avec Peter Andrews, réanimateur à Edinburgh, au Western General Hospital que j'avais rencontré en 1995. Grâce au soutien des Hospices Civils par le biais de Vincent Piriou, pour la commission de la FMC, celui de Francois Artru, alors chef de service du département d'anesthésie réanimation, et de Peter Andrews, côté écossais, j'ai pu trouvé des cadres administratif, scientifique et financier acceptables pour prendre en main une technique de traumatisme crânien expérimental par percussion fluide latérale et publier la première étude sur le traumatisme crânien expérimental et l'Epo-rh en 2008 (article 3).

Rentré en France, j'ai entrepris de retrouver une équipe d'accueil intéressée par les sujets Epo ou/et traumatisme crânien. C'est au sein de l'équipe de Laurent Bezin dont la rencontre m'a été suggérée par Frédéric Dailler, alors devenu chef du service du département après le départ à la retraite de Francois Artru, que j'ai remonté un banc expérimental similaire à celui que j'avais utilisé à Edinburgh et qui a finalisé l'inscription en thèse aboutissant à une partie du travail présenté ici. Ce travail a été réalisé et a finalisé également l'obtention d'un diplôme de Master en Neurosciences de quelques collègues médecins. Ce banc a également été à l'origine d'une collaboration, promue avant son long arrêt maladie, par Bernard Renaud, avec Stéphane Marinesco dans un projet de l'agence Nationale de Recherche (ANR projet Neurosense), projet en cours avec le laboratoire INSERM U648. Nous avons échangé avec Hervé Quintard, MCU-PH à Nice, pour une étude sur d'autres agents neuroprotecteurs qui doit commencer sous peu. Ces autres études ne seront pas présentées dans ce travail.

Dix ans ou presque après la lecture de Gorio, l'Epo-rh gardait-elle toujours un intérêt dans la traumatologie du système nerveux central ?

Après avoir présenté l'intérêt de l'Epo-rh, les origines cellulaires de l'Epo, ses modes d'action, cibles thérapeutiques des modèles expérimentaux, les études réalisées chez l'homme, nous présenterons la recherche effectuée sur le traumatisme médullaire et les raisons qui nous ont permis de comprendre l'échec de TETRAM. Ensuite, nous exposerons les raisons pour lesquelles nous nous sommes orientées vers l'étude du traumatisme crânien expérimental et les premiers résultats publiés ou en voie de l'être sur ce domaine. Après avoir rappelé les principes physiopathologiques du traumatisme crânien et de sa prise en charge, nous soulignerons les différentes modalités expérimentales de traumatismes crâniens, leurs sévérités respectives et les effets de l'Epo-rh obtenus chez les rongeurs après un traumatisme crânien expérimental de faible sévérité.

Notre recherche cloturera ce travail ici présenté.

## RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES SUR L'ÉRYTHROPOIÉTINE

---

### 2. L'ÉRYTHROPOIÉTINE: D'UNE HORMONE HEMATOPOIÉTIQUE A UNE THERAPEUTIQUE NEUROPROTECTRICE

---

#### 2.1. *Erythropoietine (Epo) : action hormonale, autocrine et paracrine sous la dépendance de l'hypoxie ; synthèse et mécanisme d'action*

L'Epo est sécrétée sous forme de pro-hormone d'une taille de 193 acides aminés avant d'être clivée sous une forme active de 165 acides aminés. Le gène codant pour l'Epo se situe sur le chromosome 7 (7q22), chez l'homme, sur le chromosome 12 chez le rat. A l'âge adulte, l'Epo circulante plasmatique est principalement synthétisée par le rein, au niveau des cellules glomérulaires endothéliales. La synthèse d'Epo n'est cependant pas exclusivement rénale ; elle s'effectue également au niveau de nombreux tissus de l'organisme (cerveau, foie, poumon, cœur) (Morsishita 1997, Sakanaka 1998, Sadamoto 1998, Maiese 2009) mais dans de beaucoup plus faibles quantités.

La synthèse d'Epo est sous la dépendance d'un facteur transcriptionnel appelé Hypoxia Inducible Factor (HIF) constitué d'un dimère. Ce dimère est composé d'une partie présente de façon constitutive et stable dans la cellule (HIF-1 $\beta$ ) et d'une autre partie instable et dégradée par l'oxygène (HIF-1 $\alpha$ ) (Bergeron 1999). HIF-1 $\alpha$  est stabilisé par la diminution de la teneur en oxygène dans le cytosol. La probabilité pour que le dimère se forme et se concentre dans le noyau cellulaire augmente en situation d'hypoxie (Bergeron 1999). L'ensemble (HIF-1 $\alpha$  + HIF-1 $\beta$ ) va se fixer sur son promoteur d'activation au niveau de l'ADN (site HRE pour Hypoxia Responsive Element) conduisant à la synthèse de nombreux transcrits de protéines, dont l'Epo (Siren 2001), le VEGF (Jin 2000), le Transporteur du glucose (Bergeron 1999) ainsi que l'Hème Oxydase (Lee 1997). HIF-1 $\alpha$  est activé dans des modèles expérimentaux d'AVC focaux ou globaux (Bergeron 1999, Bernaudin 1998), et de traumatisme crânien expérimental (Anderson 2009). HIF est également un promoteur de l'activation des gènes c-Myc et Notch (Maiese 2009). Une mise en condition hypoxique pendant au moins 180 minutes induit avec un délai minimum de 48h une forte augmentation de HIF et une multiplication par 7 du nombre de transcrits de l'Epo (Prass 2003).

L'Epo a deux fonctions principales :

- 1- l'Epo circulante va avoir pour effet principal d'augmenter le nombre d'érythrocytes pour augmenter les apports en oxygène. L'Epo circulante agit sur les tous premiers précurseurs hématopoiétiques situés au niveau de la moelle osseuse en augmentant

leur renouvellement et, parallèlement, en induisant la différenciation de certaines de ces cellules en cellules érythrocytaires (globules rouges), principal transporteur de l'oxygène.

- 2- La fonction autocrine et paracrine de l'Epo tissulaire a pour objectif d'augmenter la résistance de la cellule au déficit d'oxygène qui, s'il se prolonge, est fatal à la cellule voire même à l'ensemble de l'organisme comme en attestent les intolérances graves à la haute altitude.

L'hypoxie tissulaire dépend de plusieurs facteurs qui peuvent être manipulés par les conditions expérimentales ou modifiés en conditions pathologiques:

- 1- la pression partielle en oxygène dans le sang est diminuée en situation d'hypoxie induite soit par la diminution de la fraction inspiratoire en oxygène comme en altitude (Sanchez 2009), soit par une altération des échanges gazeux au niveau pulmonaire lors des pneumonies graves.
- 2- La concentration d'hémoglobine dans le sang diminue au cours des anémies (hémorragies, prélèvements sanguins, carences).
- 3- La perfusion tissulaire est diminuée en cas d'hypotensions artérielles (pharmaco-induites, états de choc). L'augmentation de la pression dans les tissus au cours de la formation d'œdème réduit également la perfusion tissulaire et donc les apports en oxygène.
- 4- Des composés pharmacologiques ou toxiques peuvent modifier la libération d'oxygène depuis les sites transporteurs que sont les globules rouges (desferioxamine, monoxyde de carbone).

## ***2.2. Le récepteur de l'Erythropoïétine : un récepteur transmembranaire couplé à JAK-2***

Pour avoir une action cellulaire, l'Epo doit se lier à son récepteur (Sanchez 2009). Le récepteur à l'Epo (EpoR) est une protéine de 56 KDa, membre de la superfamille des récepteurs des cytokines. La localisation du gène *epoR* se trouve sur le chromosome 19 chez l'homme, sur le chromosome 8 chez le rat et sur le chromosome 9 chez la souris.

L'EpoR est composé de 2 monomères transmembranaires dont le site de fixation de l'Epo se situe sur le domaine extra-membranaire. Lors de la liaison de l'Epo sur son récepteur, l'EpoR change de conformation (dimérisation). Sur le domaine intra-membranaire, ce changement de

conformation active spontanément une protéine qui lui est étroitement liée (Jak-2, Janus Kinase-2). Jak-2 a plusieurs sites d'action :

- i) elle transforme le facteur de transcription STAT5 (Signal Transductor And Transcription) en forme active. STAT5 augmente la production de la protéine Bcl-xL, qui, elle, inhibe l'apoptose mitochondriale dépendante du cytochrome-c (Chong 2003) ;
- ii) elle active la forme ERK-1/2 (Extracellular Regulated Kinase-1/2) de la MAP-kinase (MAP=Mitogen Activated Protein) (Kilic 2005) ;
- iii) elle permet l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B lors de phénomènes ischémiques (Digicayloglu 1995, 2001). Pour ce faire, l'activation du récepteur Epo-R provoque la phosphorylation de I $\kappa$ B (inhibiteur de NF- $\kappa$ B), qui, sous cette forme, est préférentiellement dégradé. Outre l'activation de gènes anti-apoptotiques (XIAP, c-IAP2, Cu,Zn-SOD, Mn-SOD), NF- $\kappa$ B réduit l'activation de la caspase-3 qui est une des premières enzyme à l'origine du déclenchement de l'apoptose soit par la voie intrinsèque, soit par la voie extrinsèque de la cytochrome-c mitochondriale.
- iv) Jak-2 active P3IK/Akt qui est impliqué dans les phénomènes d'apoptose

### ***2.3. L'Epo et l'EpoR indispensables à l'embryogénèse***

Chez les fœtus, la synthèse d'Epo est indispensable à l'embryogénèse. Les fœtus de rongeurs chez lesquels le gène *epo* est invalidé sur les deux allèles (homozygotes *epo*<sup>-/-</sup>) naissent prématurément et avec des anomalies cardio-encéphaliques graves (Yu 2001). Sur les produits de conceptions humaines, des auteurs ont montré que la synthèse fœtale d'Epo se fait de façon prépondérante au niveau hépatique et que cette synthèse devient prépondérante au niveau rénal seulement en fin de grossesse après la 30<sup>e</sup> semaine de gestation (Dame 1998). Après la naissance jusqu'à l'âge adulte, c'est au niveau rénal que se situe la principale source d'Epo.

Chez le fœtus, la présence d'EpoR est également indispensable à l'embryogénèse. Les souris transgénique *epoR*<sup>-/-</sup> sont non viables (Yu 2001). Les embryons sont porteurs de nombreuses malformations cardiaques et cérébrales incompatibles avec la vie

Chez l'humain, l'Epo et l'EpoR sont présents dans les embryons dès la 5<sup>e</sup> semaine de gestation (Juul 1998). Leur présence a été identifiée par RT-PCR et change au cours de la gestation. L'Epo et son récepteur, l'EpoR, sont retrouvés dans de nombreux tissus: rein, foie, cœur, cerveau, rétine, poumon, surrénales, rate, intestin, peau, cellules endothéliales. L'Epo et

l'EpoR sont présents au cours de la gestation au niveau de l'encéphale. L'EpoR est plutôt localisé sur les astrocytes, l'Epo plutôt sur les neurones (Chen 2002).

#### 2.4. *Variations des concentrations d'Epo en situation pathologiques chez l'homme*

##### 2.4.1. **Chez le nouveau-né et l'enfant**

Les concentrations d'Epo ont été analysées dans le liquide céphalo-rachidien et dans le plasma dans certaines situations critiques chez l'homme. Chez 114 nouveaux nés ou enfants au décours soit d'une asphyxie néonatale (score de conscience bas, concentration plasmatique en lactate élevée, épilepsie), soit d'une méningite, soit d'un trouble sévère des échanges gazeux chez le plus grand enfant, soit d'une hémorragie intraventriculaire, et enfin soit d'un groupe de nouveau nés ou enfants contrôles suspects de méningite infirmée par la bactériologie, Juul et col ont montré que les concentrations d'Epo dans le sang et dans le LCR étaient très bien corrélées. Les concentrations d'Epo dans le LCR étaient 4 fois plus élevées pour les nouveaux nés ayant eu une hémorragie intraventriculaire que pour les contrôles et plus élevée que le groupe des enfants ayant eu une asphyxie. Dans le groupe avec hémorragie intraventriculaire, les concentrations d'Epo dans le LCR étaient supérieures à celles observées dans le plasma pour plus de la moitié des couples de prélèvements. Par contre, dans un contexte de méningite documentée, les concentrations d'Epo dans le LCR ou dans le plasma ne sont pas majorées (Juul 1999).

##### 2.4.2. **Hémorragie sous arachnoidienne**

Springborg et col ont mesuré les concentrations d'Epo dans le plasma et le LCR de patients ayant une dérivation ventriculaire externe installée dans les suites d'une hémorragie sous arachnoidienne grave (HSA) (Springborg 2003). Sur 83 couples d'échantillons prélevés sur 18 patients, quelques uns seulement, étaient en dessous des limites de la détection. La moyenne de la concentration d'Epo dans le LCR avoisinait 1 UI/mL. Aucune corrélation entre les concentrations dans le plasma et le LCR n'était retrouvée. En comparant les concentrations d'Epo à celles d'albumine ou de pré-albumine, transferrin, a<sub>2</sub>-macroglobuline et ApoE, les auteurs concluaient à une synthèse intracérébrale d'Epo (Springborg 2003).

##### 2.4.3. **En réanimation**

Les concentrations plasmatiques d'Epo ont souvent été documentées chez les patients de réanimation qui sont sujets à de fréquentes transfusions sanguines (Vincent 2002). Afin de

déterminer l'intérêt de l'utilisation de l'Epo-rh à visée thérapeutique pour réduire précisément les transfusions et éviter les risques immunologiques, immuno-allergiques, bactériologiques ou virologiques, et réduire les coûts économiques, Rogiers et col et Rodriguez et col ont montré que les concentrations d'Epo plasmatiques étaient déconnectées des niveaux d'anémie observé chez les patients de réanimation dès l'instant qu'un état inflammatoire, une défaillance d'organe y compris une défaillance rénale était observée contrairement aux patients du groupe contrôle (Rogiers 1997, Rodriguez 2001). Chez les patients traumatisés graves, l'Epo est élevée chez 45% des 170 patients inclus avec des valeurs supérieures à 25 UI/mL (Violet 2007). Dans plus de 80% des cas, le pic d'Epo se produit dans les 4 jours suivant l'admission.

## ***2.5. Utilisations thérapeutiques de l'Epo recombinante humaine (Epo-rh)***

### **2.5.1. Epo de synthèse**

L'Epo recombinante humaine (Epo-rh) est synthétisée à partir de la séquence génomique de l'Epo humaine insérée dans des cellules ovariennes de hamster. Certaines déficiences d'équipement enzymatique de ces cellules comme le manque de sialyl-transférase, de galactosamine-transférase ou de fructosyl-transférase, les empêche d'adjoindre à la protéine certains résidus glycosylés dont l'Epo humaine est dotée.

Des molécules transformées chimiquement par i) désialylation (asialo-Epo) ou ii) transformation par carbamylation des résidus sérine en homocitruline (Carbamylated-Epo ou CEPO) permettent d'éliminer les capacités hématopoiétiques de l'Epo-rh. Cette perte d'effets est lié soit à une modification d'affinité pour l'Epo-R, soit à des propriétés pharmacocinétiques les rendant incapables d'avoir une action prolongée sur les progéniteurs hématopoiétiques.

### **2.5.2. Les indications validées : actions hématopoiétiques**

L'Epo-rh a une indication absolue dans la compensation du défaut de sécrétion rénale d'Epo endogène dans l'insuffisance rénale chronique au cours ou juste avant la dialyse (Cody 2009). Les indications de l'injection d'Epo-rh sont maintenant limitées à un seuil maximum de concentration d'hémoglobine à 10g/dL car les risques thrombo-emboliques artériels et veineux se majorent au delà. L'Epo-rh élimine le recours à la transfusion, réduit l'anémie, améliore la qualité de vie et la tolérance à l'effort (Cody 2009).

L'injection d'Epo-rh permet également de compenser de façon efficace et rapide l'anémie carencielle diagnostiquée à la phase préopératoire, qu'elle soit secondaire à un trouble du

métabolisme du fer ou induite par des prélèvements successifs en vue d'une autotransfusion (Liumbruno 2011). L'adjonction de fer ou de nutriments spécifiques quand des carences nutritionnelles sont en cause, augmente l'efficacité de l'Epo-rh (Goodnough 2011).

En réanimation, l'Epo-rh n'est pas indiquée, même s'il semble que les patients, admis pendant plus de 48h après un traumatisme, bénéficient davantage de l'Epo-rh, non pas en terme de transfusion mais en terme de survie (Corwin 2007). Cependant, cette indication est encore débattue et pour l'heure non retenue (Cook 2007, Liumbruno 2011) même si d'autres ont pu trouver de façon rétrospectives des résultats similaires à ceux de Corwin (Tavling 2009).

Dans les anémies induites par la chimiothérapie, l'utilisation d'Epo-rh sur plusieurs semaines augmente les concentrations d'hémoglobine de 1,6 g/dL et réduit le nombre de patients transfusé de presque 20% (Wilson 2007). Dans le cadre des tumeurs solides de la tête et du cou, l'Epo-rh réduit l'espérance de vie dans 4 des 5 études regroupées dans une méta-analyse incluant environ 1400 patients. Néanmoins, la qualité méthodologique des études, même si elle tend à réduire le recours à l'Epo-rh pour les patients ayant un taux d'hémoglobine inférieur à 10g/dL, ne peut formellement affirmer un sur-risque de progression du cancer induit par Epo-rh (Wilson 2007).

### **2.5.3. Actions non hématopoïétiques**

#### **2.5.3.1. Neuroprotection : Inflammation/Apoptose/Neurogénèse : des marqueurs intermédiaires**

La neuroprotection permet, dans le système nerveux central, de diminuer les effets d'une agression cérébrale soit en diminuant les effets directs immédiats ou retardés de cette agression (diminution de l'inflammation, de la dégénérescence ou de l'apoptose, tous mécanismes concourant à l'augmentation de la mort cellulaire), soit en favorisant la récupération neuronale par neurogenèse ou augmentation de la plasticité neuronale lors de la phase de consolidation, à distance de l'agression.

La mesure des effets de la neuroprotection s'effectue soit sur des marqueurs intermédiaires, biologiques, d'imagerie, soit sur des marqueurs comportementaux ou sur la survie.

Les différents marqueurs intermédiaires de neuroprotection retrouvés dans la littérature comprennent:

- Les molécules impliquées dans l'inflammation (cytokines, chimiokines, ...)
- Les molécules impliquées dans l'apoptose, précurseur de la mort cellulaire
- la neurogenèse mesurée par l'apparition de nouveaux neurones
- L'œdème cérébral et les effets vasculaires

Ces différents marqueurs intermédiaires ont des rapports étroits d'interactions entre eux, mais ont souvent été abordés séparément entre les études.

Surtout, la mesure des effets neuroprotecteurs d'une thérapeutique doit au final s'éprouver sur la restitution ou la récupération de fonctions neurocomportementales.

#### 2.5.3.1.1. *Inflammation*

L'Epo-rh a une action anti-inflammatoire sur des modèles d'ischémie (Villa 2003), de traumatisme (Lu 2005), d'épilepsie (Brines 2000), et d'encéphalite auto-immune (Brines 2000). Dans ces différentes pathologies, cet état inflammatoire est mesuré par l'élévation de certaines cytokines en particulier l'Interleukine 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), mais aussi le TNF $\alpha$ , l'IFN $\gamma$  ou l'IL-6 (Villa 2003, Morganti-Kossmann 1997, 2007), ou par l'activation du complément (Lu 2005) au niveau du parenchyme cérébral (Ciallella 2002) ou médullaire (Gorio 2005), dans le LCR ou le liquide extracellulaire analysé par microdialyse cérébrale chez l'homme (Hillman 2005 et 2011). Cependant, l'expérimentation semble montrer que la source de l'augmentation de l'IL-1 $\beta$  est d'origine cérébrale car certains auteurs n'ont pas retrouvé d'augmentation de transcrits au niveau hépatique, ni d'augmentation de la concentration en protéine, que ce soit au niveau des broyats hépatiques ou du plasma (Kamm 2006). De plus, Villa et al ont montré sur des modèles *in vitro* (juxtaposition des cultures neuronales et des cultures astrogliales) que la dégénérescence neuronale induite par la triméthylamine (TMT) était associée à une réponse inflammatoire astrogliale, et que la neuroprotection concédée à l'Epo-rh était elle-même contemporaine d'une diminution de la réponse inflammatoire. Toutefois, l'effet de l'Epo-rh sur la réponse inflammatoire était indirect, secondaire à la réduction de la neurodégénérescence. L'incapacité de l'Epo-rh à contenir la réponse inflammatoire astrogliale était renforcée par la démonstration de l'incapacité de l'Epo-rh à réduire la réponse inflammatoire induite par le lipopolysaccharide (LPS), aussi bien *in vivo* que sur des cultures de cellules astrocytaires (Villa 2003). Ces études démontrent donc que les effets

neuroprotecteurs de l'Epo-rh ne sont pas consécutifs à une action directe sur les cellules astrogliales visant à réduire leur réponse inflammatoire, mais à une action directe de l'Epo sur les populations neuronales.

Dans un contexte traumatique périphérique, il a été montré que la réaction systémique inflammatoire après une fracture expérimentale du tibia s'exprimait au niveau central y compris dans des aspects mnésiques (Cibelli 2010). L'interleukine-1 $\beta$  y tiendrait une place centrale puisque i) les souris transgéniques n'exprimant pas le récepteur de l'IL1 $\beta$  mais aussi ii) l'adjonction d'antagoniste soluble du récepteur de l'IL-1 $\beta$  amendait l'inflammation, la réaction microgliale au niveau de l'hippocampe et les troubles mnésiques (Cibelli 2010).

Dans un modèle de traumatisme médullaire, l'activité anti-inflammatoire de l'Epo-rh recouvre en partie celle de la méthylprednisolone (MPS) même si les résultats histologiques et comportementaux sont très différents entre les deux composés (Gorio 2005). De plus, l'association de MPS à l'Epo-rh amende les effets bénéfiques observés avec l'Epo-rh dans ce contexte (Gorio 2005)(voir *infra* pour hypothèses expliquant cette antagonisme).

#### 2.5.3.1.2. Mécanismes moléculaires associés à l'apoptose neuronale

##### 2.5.3.1.2.1. Cytochrome-c et caspases

Le cytochrome-c active la transformation de pro-caspase-9 en caspase-9 qui, comme la caspase-8 (toutes deux étant des caspases « initiatrices ») active les caspases « effectrices » que sont les caspases -3, -6, et -7. La caspase-3 est l'effecteur final de l'apoptose tant de la voie intrinsèque qu'extrinsèque. La caspase-3 agit en clivant la PARP-1 (Poly-(ADP-ribose) polymérase-1) en forme active, elle même s'attaquant à l'ADN cellulaire (Stein 2007) mais également à de très nombreuses autres protéines (Chong 2002).

Par exemple, sous l'influence d'un stress, la protéine p53 active des protéines de la famille des B-CCL-Lymphoma-2 (BcL-2) dont certaines sont activatrices de l'apoptose (BAD, BAX, BID, BIM) et d'autres inhibitrices de l'apoptose (BCL-2, BCL-XL), toutes participant à l'activation de la voie intrinsèque du cytochrome-c. L'équilibre de la régulation entre ces deux sous catégories de la même famille de protéines va entraîner l'apoptose ou la survie cellulaire, l'activation des récepteurs CD95 ou FAS, l'inhibition du relargage de cytochrome ou du clivage de certaines caspases.

Enfin les caspases-1 et -4 sont considérées comme des caspases inflammatoires régulant les messages inflammatoires en particulier renforçant la sécrétion d'IL-1 $\beta$  (Chong 2002).

Il existe une interconnexion étroite entre les systèmes d'apoptose intrinsèque et extrinsèque, puisque la caspase-8 peut activer BAD dans certaines conditions (Cernak 2002, Zimmermann 2001, Mehlen 2006). Cette interconnexion s'étend également aux interactions entre les systèmes pro- et anti-apoptotiques (Cernak 2002).

#### 2.5.3.1.2.2. NFκB

NFκB ou (nuclear factor Kappa-B) agit par l'inhibition du récepteur du TNF et participe à la tolérance cérébrale à l'ischémie et à l'épilepsie (Blondeau 2001). Son activité protectrice est augmentée par le préconditionnement ischémique. L'inhibition de l'EpoR et/ou de JAK2 réduit les effets anti-apoptotiques de NFκB (Digicayloglu 2001). Enfin, NFκB interagit avec HIF-1a pour l'initiation de la transcription génique induite par HIF (Figuroa 2002). Par l'intermédiaire de l'inhibiteur des caspases (IAPc), NFκB bloquerait le clivage de certaines caspases (Reed 2001).

#### 2.5.3.1.2.3. Akt1/PI3K

La protéine Kinase-B (Akt1), une enzyme cible de la phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K), est indispensable pour prévenir l'apoptose et la différenciation des cellules progénitrices des érythrocytes (Uddin 2000). Akt1/PI3K agit en particulier en bloquant BAD dans la cascade de l'apoptose. Elle préviendrait la libération de cytochrome-c et la cascade d'activation des caspases (Kennedy 1999, Chong 2002). Elle agit aussi en favorisant l'expression de NFκB (Figuroa 2002).

#### 2.5.3.1.2.4. MAPK

La protéine Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) phosphatase-1 (MKP-1) est une enzyme à la triple spécificité d'être engagée dans la régulation de la survie cellulaire, la différenciation et l'apoptose par l'inactivation par déphosphorylation de la MAPK. Elle se subdivise en 3 classes : la classe des kinases régulées par les signaux extracellulaires (ERK1/2 ou extracellular Signal-Regulated kinase), la classe des Jun-kinases (JNKs ou Jun N-Terminal Kinase) et la kinase p38. MKP1 pourrait inhiber le signal MAPK/ERK et avoir une action protectrice cérébrale promue par l'Epo (Huang 2009, Valable 2010).

#### 2.5.3.1.2.5. Effets de l'Epo-rh sur l'apoptose

Les effets favorables de l'Epo-rh sur l'expression des MAPK et MKP-1 et ERK1/2 ont été retrouvés pour des modèles de traumatisme crânien (Valable 2010), de traumatisme

médullaire (Huang 2009) ou de lésions par axotomie du nerf rétinien (Kilic 2004). L'Epo-rh augmente l'expression de PI3K-Akt1 (Siren 2001).

L'Epo-rh réduit l'activation des caspases, réduit la fragmentation de l'ADN et diminue le nombre de cellules en apoptose, dans un modèle d'hypoxie ischémique chez les rats nouveau-nés (Spandou 2004) (Van der Kooij 2008, Van der Kooij 2009, Fan 2011). Par contre, l'Epo-rh, dans ce même modèle, n'a aucune activité ni sur l'intégrité neuronale mesurée par MAP-2, ni sur la Myelin-Based Protein, constituant des axones des fibres blanches (Van der Kooij 2009, Fan 2011).

Globalement, sur les marqueurs de la famille Bcl, l'Epo-rh réduit l'expression des marqueurs pro-apoptotiques (Kumral 2005) et augmente celle des marqueurs anti-apoptotiques (Sola 2005).

Sur des cultures cellulaires, Digicayloglu et Lipton ont montré que le NFκB et la phosphorylation de son inhibiteur IκB étaient augmentés de façon dose dépendante par l'Epo-rh (Digicayloglu 2001). Cet accroissement avait comme conséquence une augmentation de la fixation de NFκB sur l'ADN évoquant une augmentation de la transcription des gènes cibles de NFκB.

Sur cultures neuronales, Chong et col ont montré que l'Epo endogène était insuffisamment sécrétée pour assurer la survie cellulaire en condition d'anoxie ou par l'exposition au NO. Cependant, cette insuffisance pouvait être suppléée par l'adjonction d'Epo-rh avec une efficacité qui était dépendante à la fois de la dose, d'une fenêtre thérapeutique et d'une durée d'exposition. Les effets protecteurs de l'Epo-rh vis à vis de l'anoxie ou du NO passaient par l'intermédiaire d'une activation d'Akt1 et une diminution du cytochrome-c et des caspases -1, -3 et -8 (Chong 2003).

#### 2.5.3.2. Neurogenèse

La neurogenèse correspond à la prolifération de cellules souches neuronales. Elle a été identifiée dans les zones sous-ventriculaires et dans l'hippocampe (Shingo 2001). Sur culture cellulaire, elle est favorisée par la mise en condition hypoxique (Wang 2004) et est dépendante de l'Epo car l'inactivation biologique de l'Epo dans le milieu de culture cellulaire inhibe la croissance des progéniteurs neuronaux (Shingo 2001). Cette action passe par une activation de STAT5 et de NFκB (Shingo 2001). Cette action est tributaire de l'expression de facteurs de croissance cellulaire neuronaux (Neuron Growth Factor, Brain-Derived Nerve Factor). Le BDNF est augmenté par l'adjonction d'Epo-rh *in vitro* et contrecarre les effets

neurotoxiques de la triméthylamine (TMT). Cet effet protecteur est amendé par l'administration d'un anticorps neutralisant l'activité biologique du BDNF (Viviani 2005). En outre, l'injection icv d'Epo-rh chez la souris (Viviani 2005) augmente les concentrations tissulaires du transcrit du BDNF, qui, lui-même est impliqué dans la neurogenèse (Benraiss 2001).

L'Epo-rh augmente le NGF, mais pas le BDNF après TMD par contusion. Par contre, l'induction de NGF n'est pas observée après administration de la MPS (Fumagalli 2008). Alors que l'Epo-rh permet la récupération fonctionnelle après TMD, le co-traitement Epo-rh et MPS s'avère inefficace (Gorio 2005) ; il se pourrait donc que ce dernier résultat soit la conséquence d'un antagonisme par la MPS de effets protecteurs de l'Epo-rh, dont l'origine pourrait être un blocage de l'induction du NGF par la MPS.

La neurogenèse est augmentée par l'Epo-rh (icv) chez les rats adultes (Shingo 2001) et inhibée par la neutralisation biologique de l'Epo après mise en condition hypoxique. Elle existe également après ischémie focale transitoire (Bernaudin 1999, Iwai 2007). L'ischémie associée à une hypoxie néonatale favorise l'apparition de nouveaux neurones dans la zone sous-ventriculaire et la migration de neuroblastes dans les zones corticales infarctées, et ces processus sont renforcés par l'administration d'Epo-rh (Iwai 2007, Iwai 2010, Fan 2011). De même, après ischémie focale, une augmentation des nouveaux neurones, des neuroblastes et des progéniteurs neuronaux au niveau des régions sous-ventriculaires est favorisée par l'adjonction d'Epo-rh (Wang 2004). Parallèlement, une augmentation de BDNF est observée. Sur des modèles de cultures cellulaires des zones sous-ventriculaires, ce sont les neurones qui sont sensibles à l'action proliférative de l'Epo-rh et non les astrocytes (Wang 2004).

L'Epo-rh augmente également la genèse des oligodendrocytes (Iwai 2010, Zhang 2010) au niveau des zones sous ventriculaires et dans la zone de pénombre autour de l'infarctissement ischémique (Zhang 2010).

#### 2.5.3.3. Protection vasculaire

##### 2.5.3.3.1. *Effets sur la perméabilité vasculaire*

L'intrication entre la perméabilité de la membrane vasculaire et le compartiment extravasculaire est spécifique dans le cerveau. Il définit une barrière hémato-encéphalique (BHE ; en anglais : Blood-Brain Barrier ou BBB) qui a une perméabilité très spécifique marquée par des jonctions entre les cellules endothéliales très étroites. Un certain nombre de pores de perméabilité (en particulier les aquaporines) sont affectées lors de pathologies

cérébrales. Les modifications de la BHE au cours des pathologies ont fait l'objet de modélisations par des co-cultures de cellules endothéliales vasculaires et des astrocytes (Didier 2003). Ces différentes cellules sont directement impliquées dans la modification de la perméabilité induite par les couplages astrocyto-vasculaires dans lesquels l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$  et l'endothéline-1 sont intriqués de façon interdépendante dans des mécanismes paracrines (Didier 2003). Comme les cellules endothéliales et les astrocytes en conditions de stress expriment l'Epo-R, ces cellules sont des cibles potentielles de l'Epo-rh. Ainsi, plusieurs équipes ont pu mettre en évidence des effets favorables de l'Epo-rh sur l'œdème cérébral induit par un traumatisme crânien (*voir infra pour les modèles expérimentaux de traumatisme crânien* - LFPIIm : Pascot 2007, Lescot 2010 ; CHI : Verdonck 2007, Valable 2010 ; CHI modifié : Shein 2008 ; Section corticale : Matchett 2006, Cryogénique : Siren 2006, Grasso 2007). Ces interactions entre astrocytes et cellules endothéliales dans l'œdème cérébral pourraient expliquer les résultats favorables obtenus avec l'Epo-rh lors des IRM effectuées à la phase précoce après le traumatisme crânien par l'équipe de Grenoble (Verdonck 2007, Valable 2010). Une interaction avec les aquaporines en particulier AQP4 a été évoquée pour expliquer les effets de l'Epo-rh sur la perméabilité vasculaire (Gunnarson 2009). D'autres molécules cibles de l'endothélium (ICAM-1, VCAM-1) n'ont, pour l'instant, pas fait l'objet d'étude ou de publication quant à l'efficacité de l'Epo-rh sur leur synthèse qui est augmentée en réponse à un traumatisme crânien.

#### 2.5.3.3.2. Effets sur l'angiogenèse

Un mécanisme d'angiogenèse peut être mis en jeu dans la protection vasculaire. Comme nous l'avons vu précédemment, l'hypoxie est à l'origine d'une augmentation de l'expression et de l'action des facteurs de transcription HIF-1 et HIF-2 (*voir supra chapitre I*). Dans ces actions nous avons vu que HIF-1 et HIF-2 favorisaient l'induction du VEGF (Navarro 2007). Plusieurs équipes ont montré que l'Epo-rh favorisait la sécrétion de VEGF dans différents modèles d'agression cérébrale. Ces équipes ont également montré un foisonnement vasculaire après exposition à l'Epo-rh (Valable 2010).

Dans un modèle d'ischémie cérébrale focale, l'Epo-rh augmente les taux de VEGF sécrétés par les cellules endothéliales *in vitro*, et dans la région bordant le « core » ischémique. Elle augmente, également, la formation des tubes capillaire *in vitro* ce qui est amendé par l'adjonction d'anti-VEGF (Wang 2004). L'Epo-rh augmente la densité vasculaire et le nombre de segments vasculaires *in vivo* après ischémie focale (Wang 2004). Dans un modèle d'épilepsie, l'Epo-rh augmente les concentrations protéiques et les transcrits de

l'ARNm de VEGF (Navarro 2007). L'Epo-rh augmente aussi la synthèse de néovaisseaux après hypoxie/ischémie néonatale (Iwai 2007).

#### 2.5.3.3.3. *Effets vasodilatateurs*

Les conséquences d'une hémorragie sous arachnoïdienne grave chez l'homme et dans les modèles animaux sont un vasospasme avec installation d'un déficit neurologique secondaire considéré comme d'origine ischémique (Alafaci 2000). Dans les modèles animaux, l'Epo-rh a montré une capacité à réduire les conséquences ischémiques du vasospasme (Alafaci 2000), à améliorer la survie (Buemi 2000), à réduire le vasospasme du tronc basilaire (Grasso 2003), et à préserver l'autorégulation cérébrale (Springborg 2002). Les mécanismes en jeu semblent affecter la régulation de la NO synthase, en particulier son sous-type inductible (iNOS) (Calapai 2000), résultat retrouvé également dans les modèles d'hypoxie ischémie néonatale (Kurmal 2004).

#### 2.5.3.4. Effets de l'Epo-rh sur la synthèse d'Epo et d'EpoR

Dans un modèle d'ischémie néonatale, l'Epo-rh n'a montré aucun effet par rapport au placebo sur le nombre de cellules exprimant l'EpoR ou l'Epo au niveau du cortex (Sun 2004). Ce résultat a été confirmé par étude des transcrits géniques de l'Epo et de l'EpoR. Dans un modèle de traumatisme crânien (TC), Liao et col ont observé qu'une induction des transcrits de l'Epo et de l'EpoR était présente dès la 12<sup>e</sup> heure avec un pic d'induction à la 24<sup>e</sup> heure après traumatisme crânien. L'EpoR avait une induction prolongée, au-delà du 8<sup>e</sup> jour. L'augmentation du nombre de transcrits de Bcl-2 était également observée après TC. Le traitement par l'Epo-rh administré après le TC a potentialisé l'induction de l'Epo et de son récepteur EpoR, cela dès la 24<sup>e</sup> heure (Liao 2007).

#### 2.5.4. **Efficacité neurocomportementale de l'Epo-rh sur les modèles animaux**

Mais, il nous semble que pour aboutir pleinement, la neuroprotection doit se targuer d'avoir une efficacité sur le plan fonctionnel. Pour cela, la fonction motrice ou sensitive, mnésique, émotionnelle doit retrouver au moins partiellement une capacité perdue lors de l'agression cérébrale et ce, de façon soutenu dans le temps et de façon supérieure à celle observée dans le groupe contrôle. En effet, la récupération plus lente d'un apprentissage mais à des niveaux équivalents à J14 après un traumatisme ne peut prévaloir de la supériorité d'un produit sur le placebo autrement que dans ce délai de récupération. Une équivalence peut être observée 3 mois après l'agression cérébrale ou au contraire apparaître tardivement. Dans ce cas, soit le

test employé pour mettre en évidence une différence est insuffisant pour diagnostiquer de petites modifications comportementales, soit le bénéfice de la molécule est négligeable.

Nous avons restreint notre analyse de la littérature aux propriétés neuroprotectrices à la phase aiguë d'une agression cérébrale et nous avons limité notre analyse aux modèles de traumatisme crânien ou le traumatisme médullaire expérimentaux. Pour les modalités de réalisation des tests, nous renvoyons le lecteur au dernier chapitre sur l'analyse des effets neurocomportementaux du TC expérimental.

Les études, les doses d'Epo-rh employées, les délais et répétitions de doses et les objectifs sont présentées dans le tableau suivant :

#### 2.5.4.1.1. *Traumatisme crânien*

Sur le traumatisme crânien, dans une analyse récente, Wheaton et al (2011) ont montré que l'Epo-rh était susceptible d'avoir une efficacité sur les troubles comportementaux après un traumatisme crânien expérimental. Cette revue, dont la période d'inclusion couvrait les années 1980-2009 se fondait sur seulement 2 études publiées à ce moment (Lu 2005, Yastiv 2005). Les critères d'inclusion dans l'analyse de Wheaton étaient restreints aux études basées sur une évaluation comportementales et excluait les études comportant des animaux transgéniques. Une haute qualité méthodologique était requise en particulier l'accès aux données statistiques, y compris en réponse aux demandes des auteurs quand celles-ci étaient inaccessibles dans le texte ou les figures des articles. Toutes les autres études ont été rejetées, soit par insuffisance de données statistiques, soit par un objectif principal (en général biologique, histologique ou d'imagerie cérébrale) considéré comme insuffisant par les auteurs. Il existe donc très peu de données sur l'efficacité de l'Epo-rh sur les troubles neurocomportementaux induits par le TC expérimental chez le rat.

Lu et al ont enregistré une amélioration induite par l'Epo-rh des scores composites neurologique et de l'apprentissage au 15<sup>e</sup> jour post traumatique. On peut noter que l'effet mnésique avait tendance à s'amoinrir au fur et à mesure que les tests de Morris se répétaient dans le groupe contrôle (Lu 2005) et que la différence entre les groupes disparaissait dès le 8<sup>e</sup> jour dans le test de reconnaissance d'objet (Yastiv 2005).

D'autres études n'ont pas été retenues par Wheaton. En prenant des critères plus souples, dans plusieurs études publiées par la même équipe, les résultats obtenus par l'injection d'Epo-rh après TC expérimental chez le rat ou la souris, sont concordants et montrent une amélioration

franche des scores sensitivo-moteurs, d'apprentissage et de mémorisation spatiale (Xiong 2009, 2010, Mahmood 2007, Meng 2011, Ning 2011).

Seule une étude a pu montré une amélioration des comportements de stress jusqu'à 9 mois après la lésion et l'injection d'Epo-rh (Siren 2006).

TC	Année	Auteur	Anesthésie			N/groupe	%Mort	Intensité (V, P, D, T)	GROUPES	Injections	Suivi	Neurocomportement
CCI	2007	Mahmmod	Chloral	Wistar	Male			4 ; 2,5 ; 6 ; -	Epo 5K/CEPO 50,	H6, H24	35D	MWM from D31-35
CCI	2005	Lu	Chloral	SD	Male	6*2		4 ; 2,5 ; 6 ; -	Epo 5K	D1, D4, D7, D14	D14	MWM learning D-5, memory D1-D14
CCI	2010	Xiong	Chloral	Souris	Female	6 à 10*3		4 ; 0,8 ; 3 ; -	Epo5K/CEPO	H6, D3, D7	D35	MWM (learning), FFT, mNNS
CCI	2009	Zhang	Chloral	Wistar	Males	8*3		4 ; 2,5 ; 6 ; -	saline/ Epo5K 24h48h72h	H24, H48, H72	D90	MWM (learning), FFT, mNNS
CCI	2011	Xiong	Chloral	Wistar	Males	8*4		4 ; 2,5 ; 6 ; -	CEPO x 1 vs CEPO x 3	H6 vs H6+H24+H48	D35	MWM (learning), FFT, mNNS
CCI	2011	Meng	Chloral	Wistar	Males	8*6		4 ; 2,5 ; 6 ; -	Epo1K, 3K, 5K, 7K, Sham, Naive	H24, H48, H72	D35	MWM (learning), FFT, mNNS
CCI	2011	Ning	Chloral	Wistar	Males	8*3		4 ; 2,5 ; 6 ; -	saline / Epo tot / Epo Tard	H6, H24, H48 vs H24, H48, H72	D90	MWM (learning), FFT, mNNS
CHI	2005	Yatsiv	NA	Souris	Male	7 à 10*4		NA	Epo 5K/TBI/Naive/TBI+Epo	H1, H24	D15	NNS (J1-J14), ORT (J3 et J8)
Cryo	2006	Siren	TBE	Souris	Male			60 sec, -183°, diam 1mm	Epo 5K	H0 et tous les jours 14D	M9	Hole Board, Rota-rod, Open field, EPM, MWM
Cryo	2007	Grasso	ISO	SD	Male	22*3		60 sec, -78°, diam 5mm	Epo 1K/8h for 48h or 14D	Toutes les 8h pendant 14j jours	D14	MWM D1-D14, Mean swim speed, latency

Tableau 1 : Travaux ayant porté sur le TC expérimental et l'Epo-rh avec des études neurocomportementales

Depuis Février 2009, quelques études sont parues, toutes en provenance de la même équipe, avec des résultats favorables de l'Epo-rh.

#### 2.5.4.1.2. *Traumatisme médullaire*

Dans une revue récente (Kwon 2011), les auteurs ont retrouvé 19 études ayant testé l'Epo-rh ou un de ses dérivés dans la neuroprotection après traumatismes médullaires. La plupart des études ont constaté une amélioration des scores fonctionnels moteurs mesurés le plus souvent par la méthode Basso-Beattie- Bresnahan (Basso 1995).

SCI	Année	AUTEUR	Species	N/groupe	Methode	Localisation trauma	Intensité trauma	GROUPES	Suivi	
<b>Positifs</b>										
Eur J Spine	2006	Cetin	Rats		COMPRESSION	T3	0,6N	Epo1000/Epo3000/MPSS 30 mg/kg	D3	Swim test
J Int med res	2009	Huang	Rats	20*3	Trauma WD	T10		Epo 1000	D7	BBB
PNAS	2002	Gorio	rats	12	Compression/contusion	T3/T9	0,6 N/	Epo 500/1000/3000/5000 window	28D	BBB + Swim tests
PNAS	2005	Gorio	Rats	12	Contusion	T9	1N/1sec 3 mm	Epo 5000/MPSS30/MPSS+Epo/Saline	28D	BBB
PNAS	2004	Brines	SourisKO	NA	Compression	T3	15g/4min	CEPO/Epo 10mcg/kg	4M	BBB
Arch Orthop Surg Traumatol	2009	Kontogeorgakos	Rats	30	Compression	T10	0,7 N 60 sec	Epo 1000*2/Epo 1000*14/Saline	42D	BBB
Eur J Pharmacol	2008	Fumagalli	Rats	8/groupe	Contusion	T9	1N/1sec 3 mm	Epo1000*1/MPSS30*1	28D	BBB
Neurosciences	2008	Vitarello	Rats	14*3	Contusion	T9	1N/1sec 3 mm	Epo5000/Sham/trauma	28D	BBB
Neurosciences	2007	Vitarello	Rats	7*3	Contusion	T9	1N/1sec 3 mm	Epo5000/Sham/trauma	28D	BBB
J Clin Neurosc	2007	Okutan	Rats	8*5	Contusion	T7-9	40g/cm	Sham/Trauma/Epo1000/MPS30/Vehicle	1D	BBB
Restor Neurol Neurosc	2005	Boran	Rats	17*4	Contusion	T6-7	50g/cm	Sham/Trauma/Epo5000/MPS30	14D	BBB
<b>Négatifs</b>										
Exp Neurol	2008	Mann	Rats	34/3groups	Trauma	T9	1,5mm/300m/s	Epo 5000/darbepoietin 10/saline	42D	BBB + FFT
Exp Neurol	2008	Pinzon	Rats	40*2	Compression*2/Contusion	T3/T9	; Clip//contusion 1C*1/Epo 1000*3/Saline//Epo 5000*7/Epo 5000		28D//56D	BBB + FFT
Spinal cord	2009	Guizar	Rats	7	Contusion	T9	10 g / 1,2 cm	closporine/Melatonin/MPSS30/Saline Pré/Per	42D	BBB + FFT

Tableau 2 : Travaux ayant porté sur le TC expérimental et l'Epo-rh avec des études neurocomportementales

Il existe trois différents types de traumatisme médullaire : i) ischémique par clampage de l'aorte au dessus de l'équivalent de l'artère d'Adam-kiewickz chez l'homme, ii) par compression par un clip ou iii) par contusion par un impact mécanique. Nous n'a vons analysé que les études portant sur le traumatisme médullaire.

## 2.5.5. Pharmacologie, fenêtre thérapeutique, dose efficace

### 2.5.5.1. Dose efficace

Tant pour les modèles de TMD que dans le TC Expérimental, les doses, répétitions d'injections, espacements entre les injections d'Epo-rh varient énormément entre les études et ont été présentées dans les tableaux précédants.

L'efficacité de l'Epo-rh dans la prévention des conséquences après neurotraumatologie a été démontré dès 1000 UI/kg (Gorio 2002) mais les injections étaient répétées au moins 3 jours.

En règle général, il est admis qu'une posologie de 5000 UI/kg doit être effectuée dans les minutes ou heures suivant le traumatisme. Gorio et al ont montré que l'Epo-rh injectée jusqu'à la 24<sup>e</sup> heure post-traumatique gardait un pouvoir neuroprotecteur (Gorio 2005, Leist 2004). La répétition et l'espacement entre les injections n'ont fait l'objet d'aucun consensus. La répétition des injections de façon prolongée est en corrélation directe avec l'ascension des taux d'hémoglobine (Zhang 2009, Meng 2011, Ning 2011). Certains ont rapporté une courbe en U pour l'efficacité de l'Epo-rh à différentes doses (1000, 3000, 5000 ou 7000 UI/kg), débutées à la 6<sup>e</sup> heure après le TC expérimental (Meng 2011). Le volume lésionnel et les résultats des scores cliniques effectués jusqu'au 35<sup>e</sup> jour après le TC étaient améliorés pour les doses intermédiaires et moins bons pour les plus faibles et les plus fortes doses.

### 2.5.5.2. Fenêtre thérapeutique

Plusieurs études animales ont testé les effets de l'allongement du délai de la première injection, sur l'efficacité neuroprotectrice de l'Epo-rh.

Brines pour le modèle d'AVC focal d'un coté et Cherian pour le modèle de TC expérimental de l'autre ont montré que l'injection d'Epo-rh gardait une efficacité sur le volume lésionnel quand la première injection était différée jusqu'à la 6<sup>e</sup> heure après l'agression cérébrale (Brines 2000, Cherian 2007). Au delà, l'Epo-rh perdait son efficacité. Xiong et al, dans 2 études successives après TC, ont montré que la neurogenèse persistait bien que le délai entre le traumatisme et la première injection d'Epo-rh était portée de 24 à 48h (Xiong 2010). Leist et col ont montré qu'un délai de 4h après AVC permettait de maintenir la neuroprotection induite par l'Epo-rh (Leist 2004). Dans le traumatisme médullaire, les mêmes auteurs ont constaté une perte progressive de l'efficacité de la CEPO (Epo carbamylée), quand l'injection était débutée immédiatement, 24h ou 72h après le traumatisme (Leist 2004). Enfin Xiong et al ont montré récemment que l'injection à la 6<sup>e</sup> heure de CEPO, était efficace dans la restauration des capacités neurocomportementales et la réduction du volume lésionnel. Cet effet était

encore supérieur avec la répétition des injections à la 24<sup>e</sup> et 48<sup>e</sup> heure (Xiong 2011). Par contre, les auteurs montraient que l'allongement du délai entre le TC et la première injection d'Epo-rh réduisait l'efficacité sur le volume lésionnel sans diminuer l'efficacité sur les troubles neuro-comportementaux (Ning 2011) quand la première injection était différée de la 6<sup>e</sup> heure à la 24<sup>e</sup> heure.

#### 2.5.5.3. Pharmacocinétique de l'Epo-rh

Longtemps il a été écrit que, compte tenu des caractéristiques hydrophyles de la molécule, l'Epo-rh ne pouvait pas franchir la BHE. Brines et al ont retrouvé dans le parenchyme cérébral de l'Epo biotinylée injectée par voie intrapéritonéale (2000). Chez l'homme, plusieurs études comportant de faibles collectifs de patients ont montré que le ratio entre les concentrations plasmatiques d'Epo-rh et les concentrations cérébrales dans le LCR ou le cortex était de l'ordre de 1% environ (Siren 2008). Quand une tumeur envahissait les enveloppes cérébrales, les concentrations d'Epo s'élevaient dans le LCR (Xenocosta 2006). Néanmoins, nous n'avons retrouvé aucune étude pharmacocinétique de l'Epo-rh après TC expérimental.

#### 2.5.6. **Chez l'homme**

De nombreuses études sont actuellement en cours. Nous ne reverrons que les études publiées et nous nous restreindrons aux pathologies aiguës.

##### 2.5.6.1. AVC ischémique

Ehrenreich et al ont montré par une pré-étude sur un petit collectif de patients d'abord puis ensuite sur un plus grand collectif les potentialités thérapeutiques et les limites de l'utilisation de l'Epo-rh chez l'homme atteint d'un AVC ischémique. Dans la première étude, la tolérance (13 patients), puis la preuve d'efficacité en double aveugle (phase I et IIa) étaient évaluées au 30<sup>e</sup> jour sur 40 patients. Les effets de l'Epo-rh à la dose de 33000 UI par jour administrés en 30 min pendant 3 jours dans les 8h suivant le début des symptômes, amélioraient significativement les critères biologiques (S100-β), IRM, volumétriques ou en ADC, et cliniques en particulier pour les patients les plus graves (Ehrenreich 2002). Aucune modification des niveaux d'hématocrite, hémoglobine ou taux de plaquettes n'était relevée. Les concentrations sanguines d'Epo-rh s'élevaient progressivement au cours du traitement et les concentrations d'Epo-rh dans le CSF étaient très significativement augmentées par rapport aux sujets contrôles AVC sans Epo-rh ou ayant des maladies neurodégénératives.

Dans l'étude suivante (Ehrenreich 2009), étude correspondant à une phase IIb, les auteurs ont associé l'Epo-rh (40 000 UI en 30 minutes pendant 3 jours) au traitement conventionnel par thrombolyse (tPA) des AVC ischémiques pris en charge dans les 6 heures suivant le début des symptômes chez 460 patients. Le suivi était effectué jusqu'au 90<sup>e</sup> jour par les scores cliniques et au 7<sup>e</sup> jour par une IRM. Globalement, les résultats sont négatifs voir défavorables (augmentation de la létalité) selon les critères analysés et aucune amélioration du pronostic neurologique n'a été démontrée en analyse en intention de traiter. Par contre, en analyse post-hoc, on remarque que les patients n'ayant pas eu de thrombolyse ont davantage bénéficié des effets de l'Epo-rh, d'un point de vue clinique, que ceux ayant reçu simultanément l'Epo-rh et le tPA. Dans cette étude *a posteriori*, l'efficacité de l'Epo-rh était identique à celle fournie par le tPA seul comparativement au placebo. Les auteurs n'ont pas remarqué d'ascension des taux d'hématocrite, d'hémoglobine ou de plaquettes, mais le nombre d'évènements thromboemboliques étaient significativement supérieur dans le groupe Epo-rh en ITT. Il y aurait donc plus une interaction médicamenteuse défavorable entre le tPA et l'Epo-rh qu'une inefficacité de l'Epo-rh. L'Epo-rh aurait donc des effets favorables à confirmer dans la population exclue du seul bénéfice de la thrombolyse.

#### 2.5.6.2. Hémorragie sous-archnoïdienne

Deux études ont été entreprises sur cette pathologie chez l'homme (Springborg 2007, Tseng 2009, 2010). Sur un collectif de 80 patients, l'Epo-rh sans diminuer l'incidence de vasospasme, réduisait de façon significative la sévérité de ceux-ci, l'incidence de déficit ischémique retardé, et le taux de décès. Le score clinique était supérieur dans le groupe Epo-rh. Dans une analyse post-hoc de ces premières données, les auteurs montraient que l'âge jeune, et l'absence de sepsis favorisaient les effets bénéfiques de l'Epo-rh (Tseng 2009). Enfin, l'usage des statines en association à l'Epo-rh, avait tendance à améliorer l'efficacité du traitement par Epo-rh (Tseng 2010). L'autre étude a été interrompue prématurément après avoir inclus 73 patients faute de recrutement (Springborg 2007). Alors que le groupe Epo-rh était un peu plus grave tant sur le plan clinique que sur le plan biochimique, les résultats ne montraient pas de différences entre les patients ayant reçu Epo-rh 500 UI/kg/jour pendant 3 jours et ceux ayant reçu le placebo (Springborg 2007).

#### 2.5.6.3. Infarctus du myocarde

Plusieurs études précliniques et études cliniques pilotes chez l'homme évoquent la probabilité d'un effet favorable de l'Epo-rh dans la réduction de la taille de l'infarctus du myocarde.

Pourtant, plusieurs études chez l'homme n'ont pas retrouvé cette efficacité. Il est possible qu'une différence d'efficacité de l'Epo-rh puisse être attribuée à une variabilité interspécifique car l'Epo-rh n'avait pas non plus été efficace dans un modèle porcin (Kristensen 2005), contrairement au rat. Chez l'homme, 4 études de phase I à IIb n'ont pas retrouvé d'effets bénéfiques (Najjar 2011, Osawa 2010, Lipsic 2006) contre 2 favorables (Ferrario 2011, Voors 2010). Une analyse en sous-groupe d'une des études retrouve même un effet défavorable de l'Epo-rh pour les sujets de plus de 70 ans (Najjar JAMA 2011). Une seule étude montrait une amélioration de la fonction ventriculaire (Ferrario). De plus, dans l'étude retrouvant un effet défavorable, où les auteurs ont inclus les patients ayant eu une pose de stent dans les 8 heures suivant un syndrome coronaire avec ST+ et ayant exclu les patients présentant des signes d'insuffisance cardiaque gauche, les risques d'événements indésirables (EI), d'EI graves ou d'EI majeurs (thrombose de stent, décès, récurrence d'infarctus, AVC), étaient tous significativement plus souvent observés dans le groupe Epo-rh administré à la dose de 60 000 UI toutes les 48h, 3 injections (Najjar 2011). Ceci est débattu entre les études et celle ayant le plus grand collectif de patients, montre un effet protecteur de l'Epo-rh sur les événements majeurs (Voors 2010). Les études négatives peuvent être critiquées sur le délai d'administration et la dose choisie d'Epo-rh car il a été montré chez le rat que la dose et la fenêtre temporelle d'injection étaient étroitement corrélées pour obtenir une efficacité clinique (Moon 2005).

#### 2.5.6.4. Traumatisme crânien

Aucune étude n'a montré prospectivement d'effets favorables de l'Epo-rh sur l'évolution du TC chez l'homme. Deux études actuellement sont publiées évoquant des effets favorables mais la méthodologie de ces études laisse à désirer. La première est une analyse post-hoc du sous-groupe des traumatisés crâniens inclus dans une étude d'efficacité de l'Epo-rh sur la réduction de la transfusion des patients de réanimation (Napolitano J Trauma 2008). La seconde est une analyse rétrospective de patients avec TC sévères (Tavling 2010) (Voir infra pour la définition des TC mineurs, modérés ou sévères) ayant reçu de l'Epo-rh à la discrétion des médecins les ayant en charge et apparié avec deux autres patients pour la gravité du TC, l'âge, le sexe, la sévérité lésionnelle, l'hypotension et l'anémie à la prise en charge ou la présence d'un taux d'hémoglobine inférieur à 10g/dL au cours de l'hospitalisation. Les auteurs montraient que l'Epo-rh améliorait le pronostic des patients avec TC sévères.

#### 2.5.6.5. Traumatisme médullaire déficitaire

L'Epo a fait l'objet de nombreuses études dans le traumatisme médullaire déficitaire chez le rat. A l'heure actuelle, c'est la molécule qui a été le plus testée (19 études) *in vivo* (Kwon 2011). Dans une synthèse récente, Kwon ont montré que 16 des 19 études ayant testé cliniquement l'Epo-rh, rapportaient une efficacité significative avec des protocoles thérapeutiques variables (1000 UI une fois, jusqu'à 5000 UI pendant 7 jours). Pour celles ayant obtenus des résultats négatifs, l'une avait testé l'Epo-rh avant, pendant et après le traumatisme (Guizar 2009). Mann et col (2008) ont effectué un TMD d'une rare violence (1,5 mm d'excursion à 300 m/s) avec des niveaux de récupération dans les groupes traités par Epo-rh, darbépoïetin de niveaux comparables à ceux des groupes placebo (Pinzon 2008, Mann 2008, Guizar 2009).

Enfin, Gorio et al ont montré que les effets favorables de l'Epo-rh étaient antagonisés par l'administration conjointe de méthyprednisolone (MPS) (Gorio 2005).

Cependant, aucune étude n'est actuellement publiée chez l'homme, même si plusieurs sont ouvertes de part le monde.

Il reste de nombreux points d'ombre dans l'exploration des propriétés neuroprotectrices de l'Epo-rh chez l'animal. Cependant, la pauvreté des thérapeutiques disponibles actuellement, la faible toxicité immédiate de l'Epo-rh et le recul quant à son utilisation depuis plus de 20 ans laissent penser qu'il paraît tout à fait licite d'étudier cette molécule dans le contexte de la traumatologie médullaire chez l'homme.

## ETUDES 1 ET 2 : TMD CHEZ L'HOMME

---

### 3. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES TRAUMATISMES MEDULLAIRES DEFICITAIRES CHEZ L'HOMME

---

#### 3.1. *Quelques données préliminaires sur le TMD chez l'homme*

##### 3.1.1. Neuroprotection pharmacologique dans le traumatisme médullaire chez l'homme : controverse autour des glucocorticoïdes à fortes doses

Le traumatisme médullaire déficitaire est une pathologie qui touche le sujet jeune, le plus souvent, et qui a un coût social, psychologique, familial et économique terrible. Les moyens de neuroprotection ont fait état de l'efficacité, dans les études précliniques et cliniques des fortes doses de glucocorticoïdes (Bracken 1990). D'autres n'ont pas retrouvé d'effets sur des paramètres biochimiques (glutamate, PGE2, citrulline) dosés par microdialyse dans le liquide céphalo-rachidien (Bernard 2006). Les études cliniques NASCIS, initialement accueillies avec enthousiasme, sont maintenant nettement remises en cause. En effet, alors que l'efficacité de très fortes doses de méthylprednisolone (MPS) semble avoir un effet favorable sur le devenir moteur et sensitifs, cet effet serait plus important quand le MPS est administré dans les 8h suivant le traumatisme, mais disparaîtrait chez les patients traités dans les 4h suivant le traumatisme (Bracken 1990). Plus ennuyeux, aucune étude ayant repris ce protocole thérapeutique n'a pu retrouver des résultats similaires à ceux de Bracken et col. (Pointillard 2000, Poyton 1995, George 1995, Petitjean 2000). Enfin, les effets secondaires de ces thérapeutiques immunosuppresseurs sont, eux, avérés. La probabilité d'augmentation de risque d'infection pulmonaire, de prolongement de la durée de la ventilation mécanique, de la durée d'hospitalisation, ont un niveau de preuve supérieur à ceux de la réduction du séjour, de l'amélioration du pronostic fonctionnel et à la reprise du travail induit par le MPS. Pourtant, dans une revue récente, Fehlings et col continuent de recommander l'usage des corticoïdes à fortes doses (2011) alors que d'autres canadiens ne considèrent cette thérapeutique que comme optionnelle et non fondée scientifiquement (Hugenholtz 2002).

Jusque dans les années 2000, seuls 2 produits avaient été testés dans des études randomisées et en double aveugle : les fortes doses de méthylprednisolone (MPS), et le GK11. Autant pour le MPS, comme nous l'avons vu précédemment, les résultats des études étaient partagés avec certains résultats favorables (Bracken 1990) mais d'autres non (Pointillard 2000), autant avec le GK11, les effets étaient négatifs (Gilles Perrin,

communication personnelle). Il y avait donc la place pour proposer une thérapie pharmacologique à visée neuroprotectrice. Dans une revue récente, des auteurs ont montré que sur le plan préclinique, 18 molécules (18 molécules + hypothermie) avaient montré des effets significativement favorables dans au moins 2 études différentes concernant des modèles animaux de traumatisme médullaire, avec une administration par voie systémique excluant l'injection dans le LCR, avec une mesure fonctionnelle motrice

Au total, nous avons pu constater que le recours à l'Epo-rh chez l'homme était plus à même d'être envisagé pour les patients ayant un traumatisme médullaire pour plusieurs raisons :

Les modalités d'évaluation et de lésions étaient limitées par des mécanismes traumatiques simples (cisaillement par une rupture de la continuité vertébrale, hématome, ischémie). La sélection de monotraumatisme médullaire évitait de disperser les champs de compréhension et d'interprétation de l'intrication lésionnelle comme dans la traumatologie crânienne qui doit prendre en compte les composantes émotionnelles et cognitives en plus des éléments sensitivo-moteurs.

Les modalités de mesures de la lésion médullaire étaient plus reproductibles sur un volume plus limité grâce à l'IRM qui avait déjà été validées à l'époque.

Les modalités d'évaluation de la récupération exploraient des champs plus simples comme la sensibilité et la motricité, fonction sexuelle et pouvaient plus facilement l'être par des moyens cliniques simples et validés (échelle clinique ASIA) ou neurophysiologiques reproductibles (potentiels évoqués somesthésiques, urodynamie)

Les patients et leurs familles étaient particulièrement demandeurs de proposition thérapeutiques, pouvant les amener à choisir des stratégies plus exploratoires au risque du charlatanisme contre la prudence scientifique et surtout la rigidité administrative des recherches à financement public (Pearson 2007). Au contraire, dans le cadre du TC grave, le risque de faire glisser de la mortalité à la survie avec séquelles lourdes à l'aide de l'Epo-rh méritait plus de prudence tant de la part des familles que des praticiens.

### **3.1.2. Le traumatisme médullaire en quelques chiffres**

Le traumatisme médullaire représente 12 000 nouveaux cas par an aux USA (Thurman 1999) pour environ 1000 nouveaux cas en France (B Vigué, communication personnelle). Aux USA, ils sont 200 000 à souffrir des séquelles d'un TMD. Les conséquences pour la société, mais surtout au plan personnel et familial nous obligent à un effort d'imagination pour

diminuer cet impact. Nous avons donc choisi d'explorer les potentialités de la protection neuropharmacologique de l'Epo. Après de brefs rappels anatomiques et physiopathologiques sur le TMD, nous présenterons les objectifs de l'étude TETRAM, les raisons qui ont conduit à sa clôture prématurée et les explorations épidémiologiques que nous avons réalisées.

Anatomie de la colonne vertébrale : facteurs d'instabilité

La colonne vertébrale est constituée des vertèbres et des éléments disco-ligamentaires permettant à l'ensemble, chez l'homme, de former l'architecture de la verticalité. Elle a également comme fonction d'assurer le capot de protection de la moelle épinière, centre de transmission des influx nerveux et des régulations du système nerveux autonome.

Les vertèbres sont constituées d'un corps vertébral en avant, structure massive, et des articulations en arrière. Elles définissent un espace osseux et articulaire au sein duquel se loge la moelle épinière.

### **3.1.3. Physiopathologie du traumatisme médullaire**

Le déficit neurologique observé après un TMD est consécutif à un trouble de la transmission nerveuse liée soit à une dysfonction des transmissions synaptiques, soit à un trouble de la conduction axonale soit à l'association des deux mécanismes. Cette dysfonction nerveuse correspond soit à une sidération fonctionnelle, soit à une rupture anatomique.

Le traumatisme médullaire est toujours associé à un traumatisme vertébral, au moins disco-ligamentaire en dehors des rétrécissements dégénératifs des canaux médullaires.

Il est consécutif à un traumatisme dissipant une très forte énergie. Il induit une perte de la stabilité de la structure osseuse sur au moins 2 lignes de force contiguës de la colonne vertébrale sur les trois qui assurent la stabilité de la station verticale sur au moins un étage vertébral ou métamère.

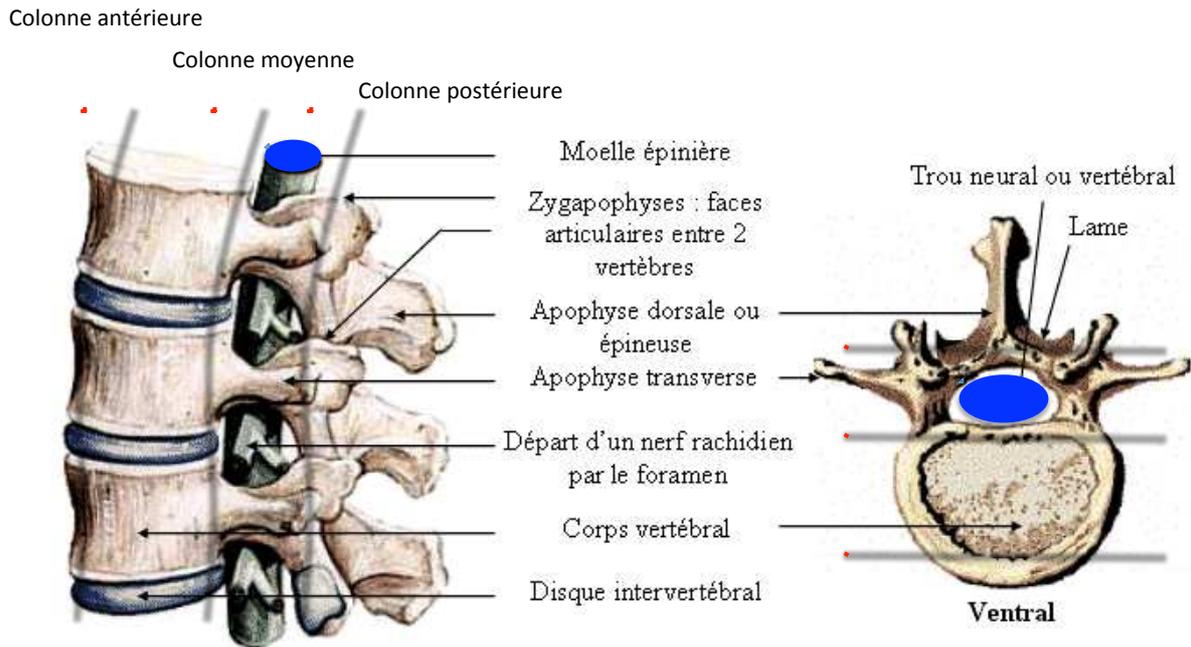


Figure 1 : Représentation schématique des vertèbres et des colonnes de forces antérieure, moyenne et postérieure qui constituent la solidité du rachis et assurent la protection de la moelle épinière.

Le TMD associe le plus souvent une fracture des lames et soit une fracture du corps en avant, soit une fracture ou une luxation des facettes articulaires en arrière. En général, ce traumatisme s'effectue par une hyper-flexion suivie par une extension forcée (mécanisme du coup du lapin).

Ce traumatisme vertébral n'est pas toujours osseux et peut intéresser parfois les structures disco-ligamentaires de façon exclusive.

Les lésions des colonnes antérieures avec atteintes médullaires sont plus fréquentes que les lésions des colonnes postérieures. A tout le moins, la récupération sensorielle est beaucoup plus fréquente que la récupération motrice.

Le traumatisme médullaire apparaît quand les contraintes mécaniques que peut supporter le rachis sont dépassées entraînant un arrachement ligamentaire ou/et une fracture osseuse. Cette perte de continuité ostéo-ligamento-articulaire envahi le canal médullaire. Les éléments osseux instables viennent comprimer ou cisailer la moelle épinière créant des oedèmes ou des hémorragies qui interrompent la conduction nerveuse soit par sidération, soit par compression soit enfin, également par rupture directe des faisceaux nerveux. De nombreux travaux tendent à montrer qu'un traumatisme médullaire par compression prolongée entraîne à long terme la création d'une cavité à l'intérieur de la moelle épinière (Sykova 2006) réduisant la surface des filets nerveux franchissant cette cicatrice. La réduction du volume lésionnel pourrait être en soi, un objectif neuroprotecteur, dans le traumatisme médullaire.

## ***3.2. Neuroprotection pharmacologique dans le traumatisme médullaire chez l'homme :***

### **3.2.1. Evaluation de la gravité du traumatisme médullaire**

Un traumatisme médullaire compromet le fonctionnement des structures nerveuses sous jacentes à la lésion ce qui définit le syndrome sous-lésionnel. Cette dysfonction nerveuse est quantifiée par une échelle internationalement validée (ASIA-American Spinal Injury Association) qui mesure l'intensité du déficit tant moteur que sensitif (Tableau 1). L'échelle ASIA sépare les patients victimes de TMD en 5 groupes : de A à E. Le grade A correspond à un déficit complet sensitivomoteur dont la probabilité de récupération est inférieure à 5% à la phase aiguë (Vigué et col, communication personnelle) et nulle en l'absence de progrès au cours des 6 mois après l'accident. Le grade E correspond à celui d'un examen clinique objectif normal consécutif à une plainte ayant fait suspecter un déficit neurologique au moins transitoire. L'échelle AIS, que nous avons utilisé dans nos publications, est une échelle qui permet de mesurer et comparer la gravité des traumatismes dans différentes régions corporelles de l'organisme. Elle est moins précise que l'échelle ASIA pour ce qui concerne l'examen neurologique, mais l'échelle AIS permet, aussi, de séparer les atteintes médullaires avec déficit complet, de celles ayant une fonction neurologique au moins partiellement conservée.

Les autres méthodes non cliniques d'évaluation de la gravité du traumatisme médullaire utilisent i) des examens électrophysiologiques qui, à l'aide d'électrodes disposées le long des cordons sensitifs, quantifient et localisent le site du blocage de l'influx nerveux après une stimulation sensitive ; ii) des études par résonance magnétique (IRM) qui identifient le ou les niveaux lésionnels (multiples dans 20% des cas) et utilisent les propriétés des protons contenus dans les molécules d'eau pour déterminer le changement du contenu (œdème, hémorragie) et l'extension (nombre de métamères) de la lésion médullaire. Enfin, des techniques encore plus précises en IRM utilisent les propriétés magnétiques des protons pour les soumettre à des champs magnétiques dans plusieurs plans de l'espace (tenseur de diffusion) pour étudier non pas les compositions moléculaires des tissus mais l'architecture des structures nerveuses, principalement au niveau de la substance blanche, architecture qui compose les faisceaux nerveux dont la moelle.

### **3.2.2. Prise en charge**

La prise en charge médicale de ces patients, à la phase aiguë, nécessite de suivre un double objectif : i) ne pas aggraver une lésion médullaire authentifiée ou non ; et ii) manquer le

diagnostic d'une lésion vitale non médullaire, masquée par le diagnostic d'un TMD. Car, rappelons le, les TMD sont toujours secondaires à des mécanismes traumatiques impliquant une cinétique élevée. Cette haute cinétique qui est à l'origine de lésions vertébrales et médullaire, peut tout à fait être aussi à l'origine de traumatismes fermés d'autres régions corporelles avec des conséquences graves.

En premier lieu, il est donc indispensable de procéder à une stabilisation du rachis lors de la prise en charge précoce par le SAMU et lors du transport à l'aide d'une minerve et d'un matelas coquille. Mais il faut aussi déjà lutter contre les pertes de certaines capacités vitales induite par la rupture du système nerveux central: i) la respiration peut être compromise par la perte des fonctions motrices inspiratoires et/ou expiratoires (toux) induisant une hypoxie et/ou une hypercapnie ; ii) l'hémodynamique peut être altérée uniquement par une perte de l'adaptation physiologique du tonus sympathique à l'origine d'une hypotension artérielle aggravant le trouble de la perfusion médullaire.

En second lieu, la prise en charge d'une autre lésion potentiellement vitale nécessitera le recours à une perfusion à l'aide de cathéter multiples en périphérie et le transport rapide vers une structure hospitalière adaptée à la prise en charge de ces patients souvent graves. Différents examens centrés autour d'un scanner corps entier avec injection de produit de contraste iodé, d'une radiographie thoracique et de bassin de face et d'une échographie de débrouillage (thorax, abdomen, cœur) seront réalisés en fonction de l'état du patient (Lieutaud 2010).

La prise en charge chirurgicale de ces patients est basée sur la décompression de la moelle épinière par élargissement du fourreau dural. Ceci permet de rétablir la perfusion médullaire et de restaurer les apports sanguins à la moelle traumatisée. L'autre objectif de la chirurgie est la stabilisation du rachis qui a été compromise par les différentes fractures conduisant à la compression médullaire. Cette stabilisation est faite à l'aide d'un système ostéosynthèse palliant temporairement l'instabilité rachidienne. Elle permet la mobilisation des patients par le personnel paramédical en toute sécurité et a montré qu'elle améliorerait le pronostic vital par le biais d'une réduction du risque d'infection pulmonaire quand elle était réalisé dans les 24h suivant le traumatisme par rapport aux patients dont les interventions étaient réalisées plus tardivement (Fehlings 2011).

### **3.2.3. Les moyens pharmacologiques**

Aucune étude autre qu'expérimentale n'a pu prouver formellement l'existence d'une efficacité d'un traitement pharmacologique dans la prise en charge de ces patients. L'usage

des corticoïdes, très utilisés au cours des années 1990 suites aux études de Bracken et al, a été ultérieurement décriée car sujette à de nombreux biais méthodologiques. Surtout, les résultats n'ont pas été reproduits ni par la même équipe, ni par d'autres (Bracken 1990, Pointillard, Kwon 2011). Enfin, il est certain que les fortes doses de corticoïdes initialement recommandées engendrent plus de complications avérées en particulier infectieuses que de bénéfices neurologiques potentiels. Compte tenu de tous ces éléments, il est admis néanmoins que malgré le faible niveau de preuve de leur efficacité, l'usage des corticoïdes ne peut être répréhensible. D'autres molécules comme la minocycline (Teng 2004) ou les immunosuppresseurs ont montré une efficacité expérimentale. A l'opposé, la gancyclidine, agoniste des récepteurs du NMDA, n'a pas montré d'efficacité malgré des résultats probants chez l'animal (G. Perrin, communication personnelle). De même, il n'existe pas, à notre connaissance, de résultats concernant des alternatives à la MPS chez l'homme pour l'instant. Et c'est bien dans le cadre de la recherche d'une alternative pharmacologique aux corticoïdes que nous avons, à de multiples reprises, construit et proposé des études cliniques, à partir des résultats expérimentaux prometteurs de l'Epo-rh dans le TMD chez le rat (Gorio 2002, 2005).

Ces résultats expérimentaux montraient tous que l'Epo-rh réduisait l'inflammation, l'œdème médullaire, la formation de radicaux libres, améliorait les scores cliniques et restaurait les capacités à la mobilisation (Kulmar 2004, Gorio 2002). Ces résultats étaient observés dans différents modèles de compression ou de contusion médullaire, étaient dose dépendant, et enfin se maintenaient au cours du temps. Après de multiples adaptations de différentes versions de protocoles basés sur l'efficacité clinique neurologique, et devant l'apparition d'un risque de maladie thrombo-embolique (MTE), nous avons alors choisi d'explorer sous un modèle bayésien, les risques thrombo-emboliques de l'usage de fortes doses d'Epo-rh au décours d'un TMD (voir le synopsis de l'étude en Annexe 1).

Le TMD est en lui-même un état à très haut risque de MTE puisque selon la méthode utilisée pour en faire le diagnostic, jusqu'à 100% des patients ont une phlébite. Par contre, seuls 15% d'entre eux environ, développent une embolie pulmonaire (SCITI 2003).

## 4. EFFETS DE L'EPO DANS LE TRAUMATISME MEDULLAIRE ? NOS ETUDES 1 ET 2

---

### 4.1. *Présentation de l'étude TETRAM*

Il paraissait assez pertinent de pouvoir débiter un essai thérapeutique dans le contexte de la traumatologie médullaire (Goldman 2002). En effet, sans réel thérapeutique pharmacologique à proposer, compte tenu i) du coût social et individuel massif de cette pathologie en regard d'un traitement relativement peu onéreux, ii) du comportement des patients quant aux séquelles et iii) du changement de vie induits par le TMD, nous étions légitimes, en tant que centre de référence sur la prise en charge des lésions osseuses de la colonne vertébrale mais aussi de la moelle épinière à proposer une prise en charge originale à l'aide de l'Epo-rh.

Après avoir tenté de proposer une étude locale ou régionale, nous avons proposé aux différents centres français prenant en charge les patients avec TMD de participer à un PHRC national à visée thérapeutique d'efficacité (phase IIb ou III). Une quinzaine de centres ont accepté de participer pour un collectif de 150 personnes par bras Epo+ vs Epo-. Nous n'avons malheureusement pas obtenu de financement. Nous avons identifié au moins 2 raisons à cela : i) la première était que la dose à tester était arbitraire, les données précliniques ayant été exportées de l'animal à l'homme ; ii) la seconde était que la fenêtre thérapeutique avait été également arbitrairement déterminée, manquant de données précliniques à l'époque. Cependant, il existait à l'époque une incertitude grandissante sur l'innocuité de l'Epo-rh au regard des risques thrombo-emboliques (Coleman 2006). Nous avons donc proposé à un laboratoire pharmaceutique de financer une étude de phase 1, visant à étudier la tolérance thrombo-embolique de l'Epo-rh chez l'homme victime d'un TMD.

Cette étude, ouverte au printemps 2007 a vu le laboratoire financeur retirer sa participation au cours de l'automne et l'étude a été close en janvier 2008 sans avoir inclus un seul patient. Pourquoi un tel échec ? Outre des difficultés locales, le retrait du financement du laboratoire a engendré un gouffre financier qui rendait la réalisation de cette étude illusoire. D'autre part, l'interrogatoire des collègues en charge de la réanimation à ce moment, a montré qu'au cœur de l'été, seul un patient susceptible d'intégrer l'étude n'avait pu être inclus. Le planning prévisionnel initial d'inclusion qui comprenait 10 patients par an pour une inclusion de 15 à 20 patients au total devenait impossible à tenir. Même avec le maintien du financement du laboratoire, notre modélisation avait été prise en défaut. Il nous fallait revoir nos données épidémiologiques.

Enfin, il est assez intéressant de noter que dans un des derniers papiers sur Epo-rh au cours de l'infarctus du myocarde (Nadjar 2011), les auteurs relatent des faits similaires aux nôtres, à savoir le retrait du laboratoire pharmaceutique initialement engagé dans le financement de l'étude, au moins pour la fourniture de l'Epo !!

#### **4.2. *Notre travail***

Nous avons recherché les raisons pour lesquelles aucun patient n'avait pu être inclus sur la période de 10 mois d'ouverture de l'étude par défaut de recrutement alors que nous avions projeté un rythme d'inclusion autour de 10 à 15 patients par an.

##### **4.2.1. Epidémiologie du traumatisme médullaire (étude 1)**

Le traumatisme médullaire correspond à un événement qui survient le plus souvent au cours d'un accident à forte cinétique et, dans 50% environ, après accident de la route (Pirouzmand 2010). Nous avons procédé à l'élaboration de 2 études distinctes, comparant deux domaines d'intérêt différent à partir du Registre des accidents du Rhône. Le registre des accidents du Rhône est hébergé à l'INRETS (Institut National de Recherche sur les Transports et leur Sécurité) maintenant, IFSTTAR (Institut Français des Sciences et Technologies des Transports, de l'Aménagement et des Réseaux). Il se fonde sur le recueil des données cliniques de patients ayant eu recours à un des 250 centres ou équipes médicales dans les suites d'un accident survenant sur une voie de circulation et ayant mis en jeu au moins un véhicule roulant (incluant les rollers, skate boards...). Ce registre effectue un codage des lésions d'organes basé sur l'échelle AIS qui permet de comparer la gravité des lésions d'organes entre elles. L'échelle AIS est subdivisée pour chaque région anatomique en 6 niveaux, le niveau 1 étant une contusion simple, le niveau 6 étant une lésion incompatible avec la vie. Le TMD est situé au dessus du niveau 4. Les fractures de rachis sont situées au niveau 2 et plus en fonction de la gravité et de l'instabilité de celles-ci (AIS 1990).

La première étude que nous avons réalisé, a comparé les incidences, mortalité et bilans lésionnels dans la traumatologie médullaire et rachidienne.

En résumé, i) l'incidence de TMD après accident de la route est de 8,9/1 000 000, calculée à partir des données du Registre des accidents du Rhône. Cette incidence est de 94,6 et 160,8/1 000 000 habitants, respectivement pour les traumatismes vertébraux les plus graves (fracture du corps vertébral, des lames, luxations) et pour les lésions corporelles AIS 4, 5 ou 6 ; ii) près de 40% des patients victimes de TMD décèdent avant (pour 90%) ou juste après l'arrivée à l'hôpital, ce qui est bien supérieur à ce qui a été publié antérieurement (Thurman 1999) ; iii)

toute lésion médullaire est toujours associée à une lésion grave du rachis ; iv) les lésions cervicales sont plus souvent létales que les lésions thoraciques.

# A 10-Year Population Survey of Spinal Trauma and Spinal Cord Injuries after Road Accidents in the Rhône Area

Thomas Lieutaud,<sup>1-3,\*</sup> Amina Ndiaye,<sup>3-5,\*</sup> Fanny Frost,<sup>6,\*</sup>  
Mireille Chiron,<sup>3-5,\*</sup> and the Registry Group

## Abstract

Fatalities or injuries following motorized and non-motorized vehicle accidents (MNMVA) are reported by police or health care systems. However, limited data exist for spinal injuries. Using an epidemiological database of road accidents occurring in a defined geographic area, we measured the incidence of major spinal trauma (MST, Abbreviated Injury Scale [AIS] score 2 or more), spinal cord injury (SCI, AIS score 4 or more), and associated lesions over a 10-year period (1997–2006). Among the 97,341 victims included, 21,623 (22.2%) suffered spinal trauma, but only 1523 (1.6%) and 144 (0.2%) sustained an MST or SCI, respectively, and among those 10% and 43% died, respectively, before reaching hospital facilities. Men were more likely to have SCI and die. Cervical injuries were more frequently observed for SCI (58%) than for MST (39%;  $p < 0.001$ ). Motorcyclists were overrepresented in SCI (33%) compared to MST (21%;  $p < 0.001$ ), and were at significant risk for fatality. Non-restrained car occupants were at risk of MST and SCI, whereas motorcyclists wearing helmets were not. The chest was the most frequently-injured body region. Nearly half of MNMVA victims suffering SCI die quickly after the crash. Young age, male gender, a motorcyclist, and non-restrained car occupant were risk factors for serious injury. These groups should be targeted in specific programs to decrease fatalities, spinal trauma, and SCI after MNMVA.

**Key words:** fatality; road crash; road users; spinal cord injury; spinal trauma

## Introduction

A SIGNIFICANT REDUCTION IN THE INCIDENCE of motorized and non-motorized vehicle accidents (MNMVA) has been observed in recent years in most European countries, and particularly in France, where the number of deaths after MNMVA decreased from more than 8000 in 1998 to fewer than 5000 in 2006, a 45% reduction. The number of injuries following MNMVA also decreased in the same proportion (ONISR, 2008).

In the Rhône area of France an epidemiological database of every MNMVA has been available since 1995. This registry covers all victims of MNMVA in the Rhône region who required medical attention in health facilities in the Rhône and vicinity.

Although police records are the usual reference source for deaths following MNMVA, the Rhône registry has allowed estimates of other types of injuries (Amoros et al., 2006, 2008). After comparing the Rhône registry with police records, it was found that the police figures for non-fatal injuries after MNMVA were underestimated by 65% (Amoros et al., 2006, 2008). In France, there has never been analysis of the numbers of those sustaining spinal cord injury (SCI) and major spinal trauma, defined as fracture and/or subluxation associated with SCI that occur after MNMVA, and their impact on fatality rates.

The present study aims to report and compare spinal trauma and SCI rates related to MNMVA, and to describe the population involved as well as their early outcomes, associated lesions, and potential risk factors.

<sup>1</sup>Service d'Anesthésie Réanimation, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Hospices Civils de Lyon, France.

<sup>2</sup>Unité Mixte de Recherche, Villeurbanne, France.

<sup>3</sup>Université Lyon1, Lyon, France.

<sup>4</sup>Unité Mixte de Recherche, T9405 (Umrestte Inrets/Lyon1/InVS), Lyon, France.

<sup>5</sup>Institut National de Recherche sur les Transport et leur Sécurité, Unité Mixte de Recherche Bron, France.

<sup>6</sup>Service d'Anesthésie Réanimation, Hôpital Neurologique, Lyon, France.

\*All authors are affiliated with the Université de Lyon, Lyon, France.

TABLE 1. MEAN ANNUAL INCIDENCES AND FATALITY RATES FOR ALL CASUALTIES, MST, AND SCI, BY GENDER (1997–2006)

	Men		Women		Male:female incidence ratio	All	
	n	Per 100,000	n	Per 100,000		n	Per 100,000
Population	773,917		836,525			1,610,442	
All casualties	60,850	786.26	36,394	435.06	1.8	97,341	604.44
All fatalities	845	10.92	300	3.59	3.0	1147	7.12
MST	1040	13.44	483	5.77	2.3	1523	9.46
MST fatalities	121	1.56	38	0.45	3.4	159	0.98
SCI	115	1.49	29	0.35	4.3	144	0.89
SCI fatalities	52	0.67	10	0.12	5.6	62	0.38

MST, major spinal trauma; SCI spinal cord injury.

## Methods

Continuous and comprehensive recording (Registre du Rhône des victimes d'accidents de la circulation) of MNMVA casualties has been in place since 1995 in the Rhone "Département" (county), whose population is 1.6 million. This registry, which is unique in France and funded by public grants, is officially recognized by the National Registry Committee (Comité National des Registres). The inclusion criterion is not the casualty's place of residence, but the crash location. Personal data are stored in agreement with the <sup>1</sup>CNIL (Commission nationale de l'informatique et des libertés).

All crash and medical data are entered into a computer for statistical analysis, with all precautions being taken to preserve anonymity and confidentiality. The data collection process includes 245 health care departments performing activities ranging from pre-hospital medical care delivered on site by mobile emergency units, to rehabilitation, and including intensive care, resuscitation, and surgery.

In the case of fatalities, detailed descriptions of injuries were available for those that died at the hospital. In the case of deaths on the scene, forensic medicine played a role by describing the injuries either after autopsy, or after external examination with or without x-ray or CT imaging.

The Registry includes data on the casualty, the MNMVA nature, the injuries sustained, and the outcome. After cross-checking from one source to another, the injuries were all coded by a single medical doctor (A.N.) using the Abbreviated Injury Scale (AIS; Association for the Advancement of Automotive Medicine, 1990), which is used by crash investigators to standardize data on the frequency and severity of motor vehicle related injuries. Each injury description was assigned a unique 6-digit numerical code, describing body region injured, type of anatomical structure, kind of injury (fracture, hematoma, or contusion), and a severity score: AIS 1 (minor), AIS 2 (moderate), AIS 3 (serious), AIS 4 (severe), AIS 5 (critical), or AIS 6 (fatal). The maximum AIS (MAIS) for the spine region (MAIS spine) is the highest AIS code for the spine

observed in each victim. The Injury Severity Score (ISS) is the sum of the squares of the highest AIS code in each of the three most severely injured body regions.

Severe major spinal trauma (MST) was defined, according to the AIS classification, as a vertebral luxation and/or fracture (R = 6, T = 5, AIS  $\geq$  2), and/or a spinal cord injury (R = 6, T = 4, AIS  $\geq$  4). This excluded minor to moderate spinal trauma without radiological (plain film, CT, or magnetic resonance imaging) signs of trauma, and isolated nerve root injuries with no fracture or dislocation. Spinal cord injuries were defined as permanent neurological deficit (R = 6, T = 4, AIS  $\geq$  4). Other injured body regions were described for injuries AIS  $\geq$  4.

Road users were categorized as car occupant, two-wheel motorized rider (2WMR), cyclist, pedestrian, truck driver, bus occupant, and other (rollers, skaters, and quad-bikes). The data for car occupants documented if the seat belt was fastened or not, and for 2WMR whether or not a helmet was worn. This study is based on a registry covering an urban area in France between 1997–2006.

## Statistical analysis

The primary end-points were to calculate the MST and SCI incidence and associated fatality rates during the 10-year period from 1997–2006. Secondary objectives were to determine risk factors and associated lesions significantly related to either MST or SCI. Statistical analysis was performed using SAS software, and  $p < 0.05$  was considered significant.

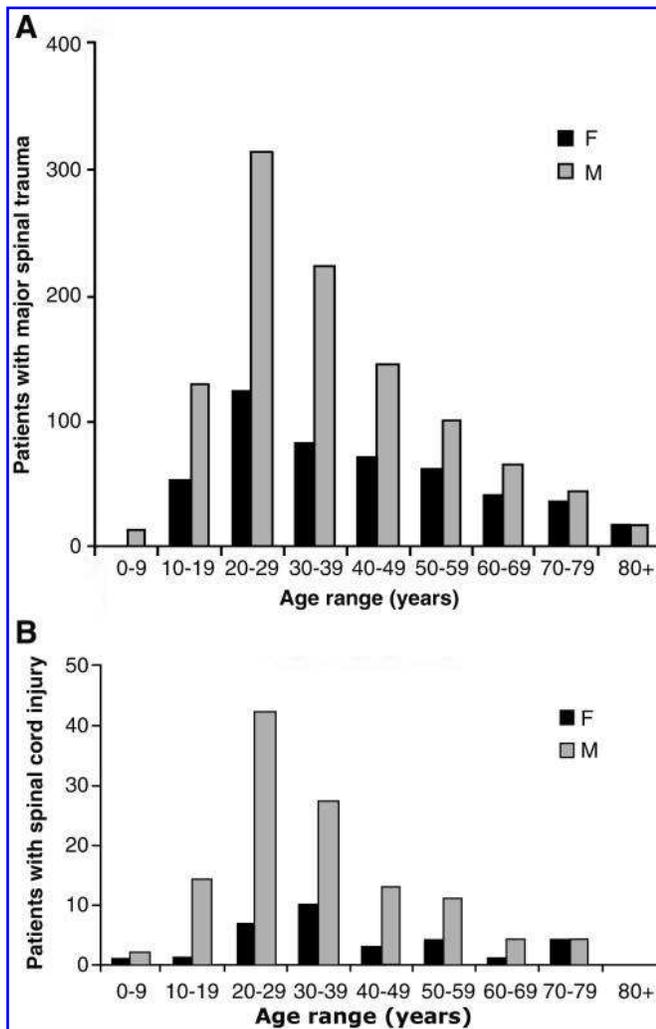
## Results

### Demographics and road users

Between 1997 and 2006, 97,341 patients were included in the registry. Among these, 21,623 suffered a spinal trauma, but only 1523 corresponded to the definition of an MST, a spinal injury with an AIS score of 2 or more. SCI (spinal trauma with AIS of 4 or more) was found in 144 patients (Table 1).

The male:female incidence ratios were 2.3, 3.4, 4.3, and 5.6, for MST, fatal MNMVA with an MST, SCI, and SCI with fatality, respectively (Table 1). The gender ratios were different for MST and SCI ( $p = 0.002$ ; Fig. 1A and B). Men were over-represented, particularly for two-wheelers, and even more so for 2WMR. Pedestrians were older than other types of road users, despite the inclusion of very young victims. Motorcyclists were the youngest.

<sup>1</sup>The Commission nationale de l'informatique et des libertés supervises the implementation of the January 6, 1978 act, as amended by the August 6, 2004 act, relating to "information technology, files and liberties" called "loi informatique et libertés." CNIL's general mission consists of ensuring that the development of information technology remains at the service of citizens and does not breach human identity, human rights, privacy, or personal or public liberties.



**FIG. 1.** (A) Age and sex distribution among patients sustaining a major spinal trauma following motorized and non-motorized vehicle accidents (MNMVA). (B) Age and sex distribution among patients sustaining spinal cord injury (SCI) following an MNMVA.

The main road users suffering MST or SCI and their spinal injury levels are shown in Table 2. The distribution of road users revealed a higher proportion of 2WMR in the SCI group (33%) than in the MST group (21%;  $p < 0.001$ ), whereas for car occupants the proportions were the same (51%). On the contrary, the share of other road users (pedestrians, cyclists, and others) was significantly reduced in the SCI group compared to the MST group (21% versus 16%;  $p < 0.001$ ; Table 2).

More than one vertebral level was involved in 135 cases (8.8%), with cervical and dorsal injuries in 62, dorsal and lumbar injuries in 60, cervical and lumbar in 25.

During the 10-year period the peak incidence for men was in those 20–30 years of age for MST and SCI, while it occurred later for women with SCI.

#### *Injury location*

MST lesions for car occupants were mainly at the cervical level, whereas they were at the thoracic level for cyclists and for 2WMR (Table 2). This result was even more marked for SCI patients.

#### *Associated lesions*

Severe associated lesions (AIS  $\geq 4$ ) with SCI were found in 73 of 144 SCI patients, accounting for 142 lesions (Table 3). Among deceased SCI patients, 23% sustained a fatal spinal cord lesion without an associated lesion AIS  $\geq 4$ . On the other hand, 70% of SCI patient survivors suffered spinal cord lesions without an associated lesion AIS  $\geq 4$  ( $p < 0.001$ ). The main body region with an associated AIS  $\geq 4$  among deceased and surviving SCI and MST patients was the thorax, followed by the brain (Table 4). MST survivors were 10 times less injured than deceased MST victims with regard to associated lesions AIS  $\geq 4$ .

#### *Outcome*

Among the MST group, 159 deaths were reported. Forty percent of them ( $n = 62$ ) had an SCI (Table 4A), and they mainly died within the first hours or days after trauma (Fig. 2). Death was mainly due to cervical injury (85% in the SCI group and 70% in the MST group;  $p = 0.02$ ). Among SCI survivors, 65% had complete neurological deficits, mainly located at the thoracic level (39/53; Table 4B). Pedestrians had the highest fatality rate among road users for both MST and SCI patients. Among MST patients, car occupants and 2WMR had similar fatality rates (9% and 11%). Cyclists had the highest ratio of survivors.

#### *Helmet and seat belt use*

Among car users, 45% (21/47) of those suffering a SCI were not using a seat belt, which was significantly higher than the 14% (5921/42,020) among those not suffering a SCI ( $p < 0.00001$ ). Similarly, among the 1379 suffering an MST without SCI, 500 had fastened their seat belt whereas 124 had not, which also differed significantly from victims not suffering an MST ( $p < 0.0001$ ).

On the other hand, among motorcyclists, helmet use did not differ significantly between patients with or without SCI (85% versus 92%) or MST (78% versus 72%).

#### **Discussion**

These were the main results of this study. (1) The fatality rate was fourfold higher for SCI than for MST due to pre-hospital mortality. Mortality from SCI was due to higher spinal level lesions (i.e., cervical instead of thoracic or lumbar), and also due to the severity of spinal cord injury (i.e., complete neurological deficit rather than incomplete). (2) For MST and SCI victims, the thorax was the main body region with associated AIS  $\geq 4$  injuries, immediately followed by the brain, both in survivors and the deceased. (3) Motorcycle riders, males, and young people were the population groups most at risk for MST, and even more so for SCI. This means that protective devices for the spine and specific training programs should be adapted toward these groups. (4) Finally, we confirmed that helmet use had no influence on SCI or MST, whereas not wearing a seat belt was associated with significantly more occurrence of both MST and SCI.

#### *Fatality of spinal cord injury and major spinal trauma*

We identified the same MST mortality rate (10.3%) as that reported for motorized riders only by Robertson and

TABLE 2. DISTRIBUTION OF THE LEVEL OF TRAUMA RELATED TO ROAD-USER CATEGORY AMONG PATIENTS SUSTAINING A MAJOR SPINAL TRAUMA (MST) OR A SPINAL CORD INJURY FOLLOWING MNMVA

	Car occupants	2-Wheel motorized riders	Pedestrians	Cyclists	Others (truck, van, skater, and other users)	Total	
MST (n)	804	329	165	124	101	1523	
Cervical level	44%	35%	39%	39%	37%	615	40%
Thoracic level	28%	44%	31%	35%	32%	500	33%
Lumbar level	34%	36%	41%	36%	41%	543	36%
Sex ratio (m:f)	1.3	11.7	1.2	6.8	5.3	2.2	
Median age (range)	33 (5–91)	29 (14–85)	52 (3–90)	39 (6–90)	35 (9–90)	34 (3–91)	
SCI (n)	73	47	13	7	4	144	
Cervical level	70%	45%	38%	57%	50%	83	58%
Thoracic level	25%	51%	46%	43%	50%	53	37%
Lumbar level	5%	4%	15%			8	6%
Sex ratio (m:f)	2.5	14.7	2.3	Only men	1.0	4.0	
Median age (range)	31 (5–77)	27 (14–64)	58 (3–77)	34 (16–53)	51 (28–74)	31 (3–77)	

Some victims had multiple spinal traumas (see text). Men were more overrepresented in the SCI group than in the MST group. The cervical level was the most common injury level among MST and SCI car occupants and cyclists. However, the distribution was different among motorized two-wheelers and pedestrians, who had more thoracic lesions.

MNMVA, motorized and non-motorized vehicle accidents.

associates (Robertson et al., 2002a, 2002b). Mortality of SCI was 30% for lower grades, but reached more than 90% for those with MAIS scores of 5 or 6. In our series, 43% of SCI victims died, but all SCI victims with a MAIS score of 6 were killed directly in relation to the crash. This proportion was close to the proportion seen after MNMVA-induced severe traumatic brain injury (TBI; Javouhey et al., 2006).

In the literature, reports were made either by in-hospital teams including only surviving patients (Goslar et al., 2008; Markogiannakis et al., 2006; O'Connor and Brown, 2002; Robertson et al., 2002a, 2002b), at hospital arrival, and by medico-legal institutions observing only the deceased (Auman et al., 2002; Preusser et al. 1995), but few studies included both the deceased and survivors with SCI following a motorized vehicle crash (Thurman et al., 1995). In contrast, we collected all data, including dead and alive victims of all road accidents (with or without motorized vehicles) occurring in the Rhône area, an urbanized region with a population density of 486 inhabitants per km<sup>2</sup>, over a 10-year period.

TABLE 3. LESIONS AIS ≥ 4 ASSOCIATED WITH SPINAL CORD INJURY (SCI) VICTIMS

Body regions injured AIS ≥ 4	Deceased (n = 62)	Survivors (n = 82)	p
SCI only	14	57	<0.0001
SCI and thorax	14	14	
SCI, head, and thorax	12	5	
SCI and head	6	3	
SCI, head, thorax, and abdomen	6	2	
SCI and abdomen	3	1	
Other associations	7		

Severe associated body lesions among deceased or surviving SCI victims in whom (1) the thorax was more injured than the brain in both groups, and (2) deceased victims sustained twice much more associated lesions than survivors ( $p < 0.0001$ ).

AIS, Abbreviated Injury Scale.

Thus focusing on SCI, we found that early death occurred for more than 75% before the patient reached the hospital. This in part explains why we found a higher fatality rate when SCI was present than did Thurman and colleagues (43% versus 21%) (Thurman et al., 1995).

To our knowledge, it has never before been shown that such a high proportion of SCI victims die at the scene or soon after the crash. However, the true mortality rate in patients with SCI or MST after MNMVA in the present work may have been underscores, due to either a lack of follow-up, which requires further investigation (Tchvaloon et al., 2008), or to a flaw in the autopsy ratio (only 38% of all registry deceased patients were autopsied). However, among the 1007 killed casualties in the registry for 1997–2006, only 161 (16%) had no AIS ≥ 4 injuries, and thus these casualties could be considered as incompletely described. Among the MST group, this was true for only 10 casualties.

More than 40% of the deceased in the MST group also had SCI, whereas the incidence of SCI was 10-fold smaller than MST in the registry. Thus, spinal cord injury may be interpreted as a risk factor for death when spinal trauma occurs.

Findings of our study are in accordance with those of previous reports with regard to the level of spinal lesions as a function of road user type (Robertson et al., 2002a). As shown elsewhere, cervical, thoracic, and lumbar lesions represented one-third each of MST, whereas the cervical level was involved in 60% of spinal cord lesions (O'Connor and Brown, 2002). We confirmed that cervical level spinal lesions were more frequently observed in car occupants, whereas thoracic lesions were predominant in two-wheel users (cyclists or motorcyclists). The types of lesions seen in pedestrians were more similar to the two-wheel group than to car occupants, with thoraco-lumbar lesions more common than cervical lesions.

Interestingly, and for the first time to our knowledge, we reported on a large group of pedestrians with spinal trauma or spinal cord injury following a road crash. Few data are currently available on spinal lesions among pedestrians, as most studies have focused on spinal injury among motorized

TABLE 4. SEVERITY AND LOCATION OF SPINAL TRAUMA, ASSOCIATED LESIONS, AND TYPE OF ROAD USER AMONG DECEASED AND SURVIVING MST OR SCI VICTIMS FOLLOWING MNMVA

	Major spinal trauma			Spinal cord injury		
	Deceased n = 159	Survivors n = 1364	p	Deceased n = 62	Survivors n = 82	p
A. Spinal lesion severity and fatality						
MAIS spine = 2	65	1090	<0.0001			<0.0001
MAIS spine = 3	32	195				
MAIS spine = 4	1	22		1	22	
MAIS spine = 5	30	60		30	60	
MAIS spine = 6	31			31		
B. Location and severity of injuries (no. of casualties for each level)						
Cervical	110	601	<0.0001*	C: 45 I: 8	C: 13 I: 20	<0.0001
Thoracic	45	454		C: 8 I: 0	C: 39 I: 6	
Lumbar	22	519		C: 4 I: 0	C: 1 I: 3	
C. Type of road user: n (%)						
Car occupants	75 (47.2)	729 (53.8)	<0.0001	32 (51.6)	41 (50.0)	NS
2WMR	37 (23.3)	292 (21.6)		18 (29.0)	29 (35.4)	
Pedestrians	34 (21.4)	131 (9.7)		7 (11.3)	4 (4.9)	
Cyclists	7 (4.4)	117 (8.6)		2 (3.3)	5 (6.1)	
Other, unknown	6 (3.8)	95 (7.0)		3 (4.8)	3 (3.7)	
D. Total associated lesions AIS ≥ 4: no. of casualties for each body region (% of injury number per victim)						
Associated lesions	204 (1.28)	231 (0.16)		68 (1.09)	32 (0.39)	
Head	79 (0.50)	102 (0.07)	<NS	25 (0.40)	9 (0.11)	NS
Face	4 (0.02)	0		4 (0.6)	0	
Neck	2 (0.1)	0				
Thorax	87 (0.55)	109 (0.08)		32 (0.52)	21 (0.26)	
Abdomen	21 (0.13)	17 (0.01)		7 (0.11)	3 (0.04)	
Pelvis or limbs	11 (0.07)	3 (0.002)		1 (0.02)	0	

\*p < 0.05 for comparison between deceased SCI and MST victims.

Among major spinal trauma (MST) or spinal cord injury (SCI) deceased or survivor victims, survivors had less severe maximum acute injury scale of the spine (MAIS) scores after MST or SCI. Cervical lesions were more often observed in deceased victims than in survivors, and more so in those with SCI than in those with MST. Pedestrians were more often seen among deceased than among surviving MST victims, a difference not observed in SCI victims. No significant differences in road user distribution were observed among SCI or MST victims. Although associated lesions AIS ≥ 4 were 10 times more often observed in the deceased than in survivors, among both MST and SCI victims, the distribution of associated lesions was not significantly different.

2WMR, two-wheel motorized rider; MNMVA, motorized and non-motorized vehicle accidents ; C, complete neurological deficit; I, incomplete neurological deficit; NS, not significant.

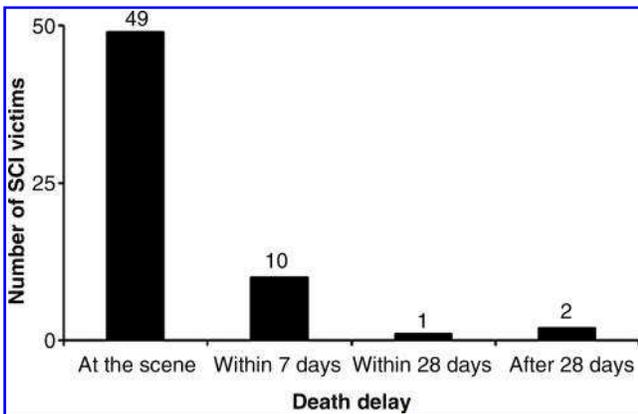


FIG. 2. Distribution of time of death after accident among patients sustaining spinal cord injuries following motorized and non-motorized vehicle accidents (MNMVA).

road users. We showed that pedestrians were the group with the highest proportion of death among both the MST or SCI groups, probably due to their older age. Their types of spinal injury were more similar to those of two-wheelers than those of car occupants.

**Associated injuries**

Compared to other reports (Robertson et al., 2002a, 2002b), we only reported potentially fatal associated injuries of AIS ≥ 4. This allowed us to compare mortality rates between the SCI and MST groups. We concluded that spinal cord injury was the unique cause of death in less than one-quarter of SCI cases, and that the thorax more than the brain was the most commonly injured additional body region in those dying of SCI. These results, which are different from those previously reported, were probably due to the recruitment in our series of all MNMVA victims, particularly those dying before reaching the hospital.

Deceased victims suffered 10 times more associated lesions AIS ≥ 4 than survivors among those with MST, with this factor decreasing to 3-fold for deceased SCI victims and

survivors. AIS  $\geq 4$  lesions of the limbs or pelvis were rarely observed.

#### *At-risk groups*

The fatality rate was highest among males and pedestrians. The risk of MST and SCI was increased among car occupants not wearing seat belts, but this was not true for helmet use.

We identified a smaller proportion of neurological deficits associated with spinal trauma for 2WMR (14.3%) and for car occupants (9.0%), than did Robertson and associates (19.8% and 14.1%, respectively; Robertson et al., 2002a, 2002b). This can be explained by the inclusion criteria for spinal trauma used by Robertson and associates, which required at least 3 days of hospitalization, whereas ours were AIS  $\geq 2$  for MST and ASI  $\geq 4$  for SCI. It may also be explained by the more urbanized area covered by the Rhône registry. However, the death ratio (10.3%) among motorcyclists observed by those authors was quite similar to ours (37/329: 11.2%), a fact that supports similar inclusion criteria. But in order to be compared with other reports, it is necessary to take into account the fact that we did not only include patients alive upon reaching the hospital.

As shown previously (O'Connor and Brown, 2002), car occupants account for half of MST or SCI lesions, followed by 2WMR (21% for MST and 33% for SCI). However, motorcycles account for only 10% of road engine sales in France. Only the 2WMR group displayed a significantly increased risk of suffering SCI compared to the injured population involved in an MNMVA. This result was also observed when compared to the MST group. In other words, two-wheelers were overrepresented in the casualty figures, particularly for life-threatening severe casualties such as SCI.

Although the 2WMR were overrepresented for SCI and MST, their fatality rates (38% and 11%, respectively) were no higher than those of car occupants. This is probably related to their younger age and spinal level of injury (i.e., thoracic rather than cervical).

On the other hand, pedestrians were had an increased fatality rate if they suffered a spinal cord injury (63%) or an MST (20%), compared to other road users, particularly car occupants (43% and 9%, respectively). Conversely, pedestrians were the oldest group among those with both MST and SCI.

#### *Other factors*

We did not find any link between helmet use and major spinal trauma or spinal cord injury in 2WMR. These results are in accordance with those of Auman and colleagues (Auman et al., 2002) and Goslar and associates (Goslar et al., 2008). In a previous report based on the Rhône registry, taking into account confounding factors, helmet use did not increase the risk of neck or cervical spine injury (Liu et al., 2008; Moskall et al., 2008). Helmet use was not associated with an increased risk of MST, SCI, or fatality. The percentage of 2WMR casualties in our study wearing a helmet was twice as high as that seen by Goslar and associates (Goslar et al., 2008), and was close to that reported by Auman and colleagues (Auman et al., 2002). This can be explained by French law, which made helmet wearing compulsory for 2WMR in 1975. These results confirm the safety of helmet wear with regard to the risk of a spinal lesion when driving a motorbike.

For car occupants, we found an association between spinal lesion or spinal cord injury and the disregard of French law requiring that a seat belt must be worn by all car occupants. This association was very high both for MST and SCI. This means that non-restrained car occupants increased their risk of spinal injuries by 41% for MST, but by 317% for SCI. As reported by Inamasu and Guiot (Inamasu and Guiot, 2007), and in the present study, the incidence of neurological deficits in the restrained group was significantly lower than in the non-restrained group (5.2% versus 16.9%;  $p < 0.001$ ).

#### *Gender and age distribution*

The comparison between patients sustaining an MST and the population of casualties included in the Rhône registry revealed that men were more overrepresented in the SCI group (4/1) than in the MST group (2.5/1). This increase in the gender ratio was more pronounced in deceased patients (5/1), and much more so in deceased 2WMR (14/1) (Robertson et al., 2002a, 2002b).

We showed that the more severe the lesion, the higher the male:female ratio. Also, the use of two-wheeled vehicles was limited nearly exclusively to males.

Age differed among road users, with younger age for 2WMR, and older age for pedestrians.

#### *Weaknesses of the study*

We do not report blood alcohol concentration, cannabis or benzodiazepine consumption, or other psycholeptic drug use, or other factors known to interfere with vigilance. However, the registry was initially designed to disclose road-induced risk factors for bodily injury following an MNMVA, not to confirm medical conditions known to be risk factors for a road crash.

The Rhône is a safe urbanized area, and its fatality rate following an MNMVA is 46% lower than that of France as a whole (ONISR, 2008). Thus the registry may underestimate the true rates of MST and SCI in France.

We do not have follow-up data for patients sustaining an MNMVA-induced MST or SCI. However, the registry does not focus on patient follow-up. Future studies should be designed to determine the true long-term mortality rate at 10 years after MST or SCI following a road crash in the Rhône area (Tchvaloon et al., 2008).

Protective measures against MST and SCI must include means of primary prevention (e.g., avoiding speeding, alcohol use, and sleepiness) for all road users. Also for motorists, seat-belt use and the use of air bags must become more widespread. For motorized two-wheeled riders, specific air bags should be designed to protect the spine.

In conclusion, SCI accounted for 0.15% of all MNMVA casualties and 9% of MST casualties. There was overrepresentation by 2WMR, young males, and non-restrained car occupants. The fatality rates among those with SCI and MST were 43% and 10%, respectively, mainly due to complete cervical injuries. Moreover, deaths following SCI occurred in 79% at the accident scene. Pedestrians were the oldest group with the highest fatality rate. Helmet use for 2WMR did not increase the risk of spinal injury, whereas not wearing a seat belt among car occupants did. Thoracic lesions were common more than brain injuries in those with AIS  $\geq 4$  associated lesions, and this should be taken into account in the early hours of care in spinal trauma patients.

## Acknowledgments

We wish to thank the following people for participating in data collection and data recording for the Rhône Road Trauma Registry Association and ARVAC president E. Javouhey. We also thank those in the INRETS-UMRESTTE research unit (B. Laumon, scientific adviser, and A. Ndiaye, medical coordinator): T. Ait Idir T. Ait Si Selmi, D. Alloatti, E. Amoros, M. Andrillat, F. Artru, Y. Asencio, I. Assossou, F. Auzaneau, F. Bagès-Limoges, G. Bagou, C. Balogh, G. Banssillon, V. Banssillon, N. Barnier, X. Barth, M. Basset, J.F. Bec, J. Bejui, J.C. Bel, E. Bérard, J. Bérard, J.C. Bernard, N. Berthet, J.C. Bertrand, L. Besson, B. Biot, V. Biot, C. Blanc, J. Blanchard, C. Bœuf, D. Boisson, M. Bonjean, J. Bost, C. Bouchedor, P. Bouletreau, M. Boyer, V. Boyer, Y. Breda, R. Brilland, S. Busserly, N. Cabet, L. Caillot, J.L. Caillot, A. Cannamela, B. Caregnato, M. Carre, Y. Catala, P.Y. Chagnon, M. Chambost, C. Chantran, P. Chardon, P. Charnay, P. Chatelain, S. Chattard, F. Chauvin, H. Chavane, G. Chazot, I. Chettouane, N. Chevreton, E. Chevillon, S. Chevillon, M. Chiron, P. Chotel, P. Cochard, C. Combe, B. Contamin, E. Coppard, T. Cot, Z. Crettenet, A. Cristini, V. Cunin, F. Dailier, B. Dal Gobbo, J.S. David, M.P. De Angelis, L. Decourt, A. Delfosse, J. Demazière, R. Deruty, G. Desjardins, J. Devaux, B. Dohin, A. Drouet, A. Emonet, J. Escarment, A.S. Evrard, M. Eyssette, L. Fallavier, L. Fanton, D. Felten, P. Feuglet, N. Fifis, J. Figura, G. Fisher, L.P. Fischer, B. Flocard, D. Floret, G. Fournier, P. Fraisse, J.F. Fredenucci, M. Freidel, P. Fuster, B. Gadegebeku, L. Galin, P. Gaillard, M. Gallon, N. Garnier, A. Garzanti, P. Gaussergues, V. Gautheron, M. Genevrier, F. Gibaud, Y. Gillet, F. Gilly, A. Goubisky, M. Granger P. Grattard, P.Y. Gueniaud, C. Guenot, A.C. Guérin, M. Guignand, F. Guillaumée, M. Haddak, D. Hamel, T. Haouas, T. Heckel, G. Herzberg, P. Ho-Van-Truc, C. Jacquemard, T. Joffre, R. Kohler, C. Lablanche, S. Lafont, C. Lagier, B. Lapierre, M.C. Laplace, C. La Rosa, R. Laurent, M. Lebel, G. Leblay, I. Le-Xuan, T. Lieutaud, R. Lille, M. Linné, R. Lucas, B. Machin, E. Maiello, D. Malicier, B. Mangola, Y.N. Marduel, M. Marie-Catherine, J.L. Martin, Y.N. Martin, G. Martinand, F. Marty, S. Mazouzi, B. Menard, C. Messikh, F. Meyer, S. Meyrand, S. Molard, O. Monneuse, E. Morel-Chevillet, E. Mioulet, F. Minjaud, C. Mollet, J. Monnet, B. Moyen, N.P. Neidhart, E. Ngandu, S. Ny, T. Ould, P. Paget, J.C. Paillot, D. Paris, B. Patay, P. Pauget, D. Peillon, G. Perrin, D. Perrin-Blondeau, P. Petit, V. Piriou, J.L. Piton, M. Plantier, P. Pornon, C. Pramayon, B. Quelard, A. Raka, L. Raquin, C. Remy, M. Rezig, A. Ricard, A. Richard, F. Rigal, D. Robert, G. Rode, J.P. Romanet, F. Rongieras, C. Roset, A. Rousson, P. Roussouli, H. Roux, C. Ruhl, J. Salamand, F. Salord, P. Sametzky, K. Sayegh, P. Sayous, N. Sbraire, N. Scappaticci, P. Schiele, M. Schneider, C. Simonet, M. Sindou, R. Soldner, M. Soudain, J. Stagnara, D. Stamm, B. Suc, K. Supernant, M.C. Taesch, F. Tasseau, L. Tell, M. Thomas, S. Tilhet-Coartet, E. Tissot, J.C. Toukou, M. Trifot, F. Tronc, B. Vallee, G. Vallet, A. Vancuyck, I. Vergnes, M.P. Verney, E.J. Voiglio, G. Vourey, J. Vuillard, M. Westphal, L. Willemen.

## Author Disclosure Statement

The authors declare they have no conflicts of interest and did not receive funding from the industry. This paper was presented in part at the Neurotrauma Symposium (Santa Barbara, CA, September 7–11, 2009).

## References

- Amoros, E., Martin, J.L., and Laumon, B. (2006). Under-reporting of road crash casualties in France. *Accid. Anal. Prev.* 38, 627–635.
- Amoros, E., Martin, J.L., Lafont, S., and Laumon, B. (2008). Actual incidences of road casualties, and their injury severity, modelled from police and hospital data, France. *Eur. J. Public Health* 18, 360–365.
- Association for the Advancement of Automotive Medicine. (1990). The Abbreviated Injury Scale, 1990 Revision. Des Plaines, IL: Association for the Advancement of Automotive Medicine.
- Auman, K.M., Kufera, J.A., Ballesteros, M.F., Smialek, J.E., and Dischinger, P.C. (2002). Autopsy study of motorcyclist fatalities: the effect of the 1992 Maryland motorcycle helmet use law. *Am. J. Public Health* 92, 1352–1355.
- Goslar, P.W., Crawford, N.R., Petersen, S.R., Wilson, J.R., and Harrington, T. (2008). Helmet use and associated spinal fractures in motorcycle crash victims. *J. Trauma* 64, 190–196.
- Inamasu J, and Guiot B.H. (2007). Thoracolumbar junction injuries after motor vehicle collision: are there differences in restrained and nonrestrained front seat occupants? *J. Neurosurg. Spine* 7: 311–314.
- Javouhey, E., Guérin, A.C., and Chiron, M. (2006). Incidence and risk factors of severe traumatic brain injury resulting from road accidents: a population-based study. *Accid. Anal. Prev.* 38, 225–233.
- Liu, B.C., Ivers, R., Norton, R., Boufous, S., Blows, S., and Lo, S.K. (2008). Helmets for preventing injury in motorcycle riders. *Cochrane Database Syst. Rev.* 23, CD004333.
- Markogiannakis, H., Sanidas, E., Messaris, E., Koutentakis, D., Alpantaki, K., Kafetzakis, A., and Tsiftsis, D. (2006). Motor vehicle trauma: analysis of injury profiles by road-user category. *Emerg. Med. J.* 23, 27–31.
- Moskall, A., Martin, J.L., and Laumon, B. (2008). Helmet use and the risk of neck or cervical spine injury among users of motorized two-wheel vehicles. *Inj. Prev.* 14, 238–244.
- O'Connor, P.J., and Brown, D. (2002). Relative risk of spinal cord injury in road crashes involving seriously injured occupants of light passenger vehicles. *Accid. Anal. Prev.* 34, 477–485.
- ONISR. (2008). La sécurité routière en France, Bilan de l'année 2007. La documentation française, Paris.
- Preusser, D.F., Williams, A.F., and Ulmer, R.G. (1995). Analysis of fatal motorcycle crashes: crash typing. *Accid. Anal. Prev.* 27, 845–851.
- Robertson, A., Branfoot, T., Barlow, I.F., and Giannoudis, P.V. (2002). Spinal injury patterns resulting from car and motorcycle accidents. *Spine* 27, 2825–2830.
- Robertson, A., Giannoudis, P.V., Branfoot, T., Barlow, I., Matthews, S.J., and Smith, R.M. (2002). Spinal injuries in motorcycle crashes: patterns and outcomes. *J. Trauma* 53, 5–8.
- Thurman, D.J., Burnett, C.L., Beaudoin, D.E., Jeppson, L., and Sniezek, J.E. (1995). Risk factors and mechanisms of occurrence in motor vehicle-related spinal cord injuries: Utah. *Accid. Anal. Prev.* 27, 411–415.
- Tchvaloon, E., Front, L., Gelernter, I., Ronen, J., Bluvshstein, V., and Catz, A. (2008). Survival, neurological recovery and morbidity after spinal cord injuries following road accidents in Israel. *Spinal Cord* 46, 145–149.

Address correspondence to:

Thomas Lieutaud, M.D.  
Service d'anesthésie réanimation  
Centre Hospitalier Lyon Sud  
69495 Pierre Bénite  
Cedex, France

E-mail: thomas.lieutaud@chu-lyon.fr

#### 4.2.2. Evolution de l'incidence de la traumatologie médullaire (Etude 2)

Même en se basant sur les chiffres d'inclusion potentielle publié dans notre premier article (57 patients avec un TMD sans lésion associée sur 10 ans), nous aurions dû inclure quelques patients lors des 6 à 8 mois de l'étude. Nous avons donc fait l'hypothèse que ces données ne recoupaient plus la réalité observée au cours de la période d'inclusion. Nous avons donc comparé l'incidence des TMD parmi les patients du Registre du Rhône sur 2 périodes de 6 ans chacune.

Ces 2 périodes correspondent à des périodes de relative stabilité de l'accidentologie routière au niveau national (voir figure 2) encadrant l'année 2002. Cette dernière est une année charnière promouvant une pratique beaucoup plus dure, répressive et éducative sur le plan de la sécurité routière.

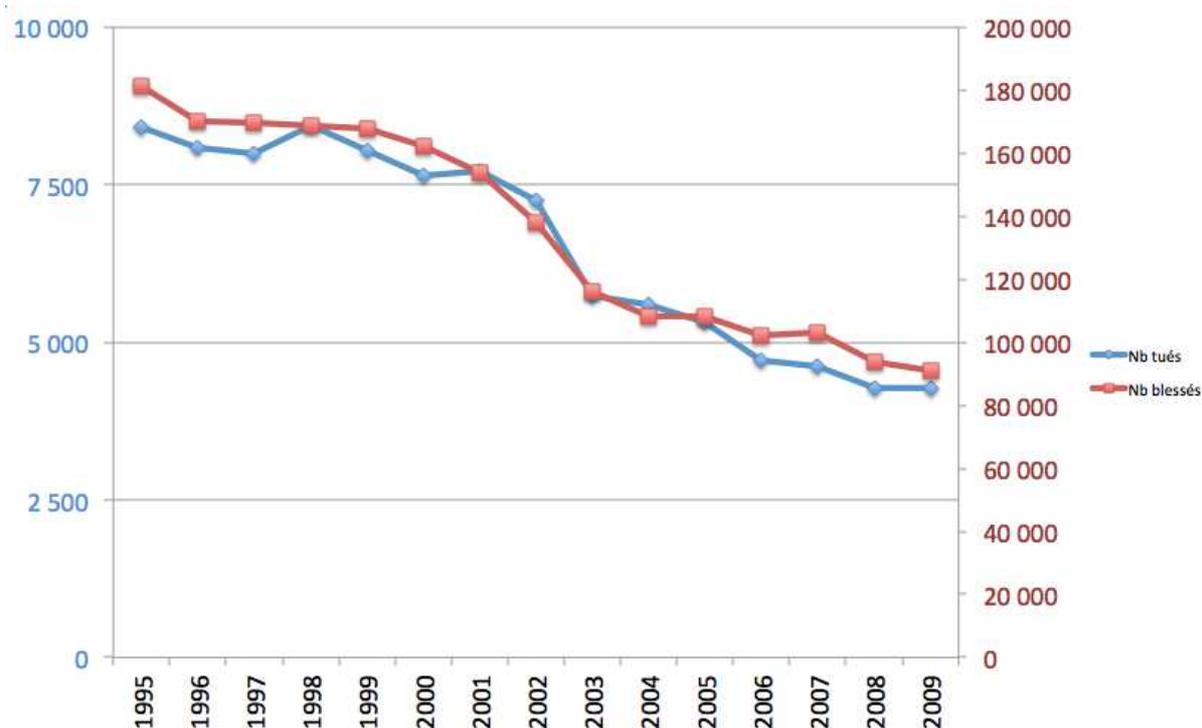


Figure 2 : Nombres de tués (ordonnée de gauche) et blessés (ordonnées de droite) en France par années, entre les années 1995 et 2009. On note un décrochage très significatif marqué au moment de l'année 2002 entre 2 périodes (1995-2001 et 2003-2008) de pentes de décroissance plus régulières et similaires.

Cependant, en opposition avec ces données, nous avons montré que l'incidence des TMD après accident de la circulation n'avait pas changé. Les observations faites dans ce second travail portent sur la comparaison entre une période récente (2003-2008) où différentes

modifications de la législation routière concluant une cause déclarée nationale par l'ancien président de la république en 2002, ont aboutit à une modification des comportements sur la route et une réduction des vitesses moyennes de tous les usagers de la route. Pourtant, alors qu'il existe une diminution de la mortalité de 33% sur la période récente, une diminution de 35% de l'accidentologie routière ou des blessés graves, une diminution de 22% de l'accidentologie à l'origine d'un traumatisme vertébral sérieux, il n'y a pas eu de changement en terme d'incidence de la traumatologie médullaire, et, il y a même une augmentation non significative de la mortalité parmi les TMD (Article 2).

# Journal of Neurotrauma

Journal of Neurotrauma: <http://mc.manuscriptcentral.com/neurotrauma>

**Spinal cord injuries sustained in road crashes are not on the decrease in France:  
A study based on epidemiological trends.**

Journal:	<i>Journal of Neurotrauma</i>
Manuscript ID:	NEU-2011-1880.R2
Manuscript Type:	Regular Manuscript
Date Submitted by the Author:	02-Sep-2011
Complete List of Authors:	lieutaud, thomas; Centre de recherche en Neurosciences, Equipe TIGER, CNRS UMR 5292, INSERM, U1028 Ndiaye, Amina; Umrestte, Ifsttar, Institut français des sciences et technologies des transports, de l'aménagement et des réseaux, Université de Lyon, F69007 Lyon Laumon, Bernard; Umrestte, Ifsttar, Institut français des sciences et technologies des transports, de l'aménagement et des réseaux, Université de Lyon, F69007 Lyon Chiron, Mireille; Umrestte, Ifsttar, Institut français des sciences et technologies des transports, de l'aménagement et des réseaux, Université de Lyon, F69007 Lyon
Keywords:	spinal cord injury, EPIDEMIOLOGY, TRAUMATIC SPINAL CORD INJURY

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1  
2  
3  
4 **Spinal cord injuries sustained in road crashes are not on the**  
5  
6  
7  
8 **decrease in France:**  
9

10  
11 **A study based on epidemiological trends**  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

## **Abstract**

Traumatic Spinal cord injuries (SCI) are rare but extremely costly. In order to improve the modelling of inclusion criteria for studies of SCI it is necessary to determine what epidemiological trends affect SCI.

Using the Rhone Registry, which contains all the casualties resulting from road crashes in the Rhône département of France and codes their injuries using the Abbreviated Injury Scale (AIS), we describe the epidemiological trends that affect spinal cord injury (SCI), major spinal trauma (MST) and severe injuries (AIS4+) to other body regions between two periods 1996-2001 and 2003-2008.

Although there has been a marked decrease (35%) in the incidence of casualties after a road traffic crash, and reductions of 22% in the incidence of MST and 33% in that of severe injuries (AIS4+) ( $p < 0.001$ ), for SCI the incidence rate and number of casualties have remained surprisingly stable. In the second period, there was no change in the incidence of SCI resulting from road traffic crashes, nor in the associated fatality, mortality and survival rates. The incidence for car users was significantly lower in the second period. This contrasts with the incidences for motorcyclists and for the group including pedestrians and cyclists which were respectively 47% and 77% higher in the second period. The median age of the casualties, the age-adjusted incidence of SCI and the number of associated injuries were also higher in the second period.

We have observed a marked reduction in the incidence of road trauma including the most severe injuries, but not SCI. The higher proportion of motorcyclists, the increase in the age of casualties and the greater presence of multiple injuries are new factors in the epidemiology of SCI after a road crash.

**Key words : Spinal cord injury, Spine, Trauma, Road crash, epidemiology, trend**

## **Introduction**

There are approximately 1,000 new cases of spinal cord injury (SCI) every year in France, and about 50% of them are due to road traffic accidents which gives an incidence of roughly 1 per 100,000 population (1). The associated economic, social and psychological costs are enormous, no doubt in excess of the 500,000 to 2 million dollar lifetime settlement proposed to each individual in the USA (2).

However, in order to improve prevention and patient care, including the use of new therapies, it is crucial to be able to describe the trends affecting the incidence of SCI (3,4) and the survival of patients with the condition (5-7). This would make it possible to avoid overestimating the number of cases that could be included in future studies. The main goal of this observational study was to describe the trends that affect spinal cord injuries resulting from road crashes using the data in the Rhône Road Trauma Registry. To do this, we compared two six year observation periods with a gap between them (1996-2001 and 2003-2008). Very surprisingly, in spite of the extremely significant drop in road trauma, particularly in terms of the 35% fall in the number of casualties with the most severe injuries, there has been no change in the incidence and mortality of SCI.

## Material and methods

The Rhône Registry has been described elsewhere (1,8). Briefly, it covers the Rhône département (1.6 million inhabitants) and has been approved by the health authorities (Comité National des Registres) and the National Commission for Information Technology and Civil Liberties (CNIL)<sup>1</sup>. The Registry, which is funded by public grants, contains the demographic characteristics of each casualty as well as the features of the accident (type of road users, location, date, time of day), and a description of the injuries sustained. The inclusion criterion is a road traffic accident involving at least one vehicle, motorized or not, occurring in the Rhône département and requiring health care activity. Inclusion of a casualty in the Registry is the result of the cooperation of 245 healthcare structures which administer care to road traffic casualties. The collaboration of primary care teams and forensic medicine institutes means that the Rhône Registry also includes casualties who die at the scene of the accident. All the injuries were coded by the same doctor (Amina Ndiaya) using the Abbreviated Injury Scale (AIS version 90)(9).

“The AIS was developed to provide researchers with a simple numerical method of ranking and comparing injuries by severity, and to standardize the terminology used to describe injuries. First, the AIS is based on anatomical injuries which distinguishes it from other systems that depend on physiological parameters. Second, the AIS assigns scores to injuries and not the consequences of the injuries.

The AIS scale is a consensus-derived anatomically based system that classifies individual injuries by body region on a 6-point ordinary severity scale ranging from AIS 1 (minor) to AIS 6 (currently untreatable). Empirical data show that the AIS correlates with the probability of death for AIS  $\geq 3$ . The Maximum AIS (MAIS), which is the highest single AIS code in a patient with multiple injuries, has been used to describe overall severity.

1  
2  
3 The Injury Severity Score (ISS) is the sum of the squares of the highest AIS scores for three  
4  
5 different body regions. The ISS gives a much better fit between overall severity and the  
6  
7 probability of survival.  
8  
9

10 Injuries are described as follows:

11  
12 R = body region (R = 6 means the Spine)

13  
14 T=Type of anatomic structure (T = 4 means the spinal cord, T = 5 means the vertebrae and  
15  
16 disks)  
17  
18

19  
20 S= Specific anatomic structure (S = 02, 04, 06 mean the cervical, thoracic and lumbar spine  
21  
22 respectively).  
23

24  
25 In the present study, Major Spinal Trauma (MST) was defined on the basis of (R = 6, T = 4 or  
26  
27 5, AIS  $\geq$  2) and included spinal luxations and/or fractures and/or spinal cord injuries. This  
28  
29 excluded minor spinal trauma without radiological signs of trauma (by either plain film, CT  
30  
31 or magnetic resonance imaging) and isolated nerve root injuries with no fracture or  
32  
33 dislocation. Spinal cord injuries were defined as injuries resulting in permanent neurological  
34  
35 deficit: R=6, T = 4, AIS  $\geq$  4. Any other injured body regions were described for AIS  $\geq$ 4  
36  
37 injuries.  
38  
39

40  
41 Temporary paraparesia or tetraparesia (coded AIS= 3) were not included in the study. In the  
42  
43 case of casualties with a persistent complete deficit, cervical SCI was coded AIS 5 and  
44  
45 thoracic or lumbar SCI was coded AIS 4.  
46  
47

48  
49 All the patients in the Registry with SCI also had MST. The AIS cannot differentiate between  
50  
51 different levels of incomplete neurological deficit. That is to say that no distinction was made  
52  
53 between classes B, C, D of the American Spinal Injury Association/International Spinal Cord  
54  
55 Society neurological standard scale, all of them being included in the AIS 4 score.  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 Road users were categorized as car occupants, motorcyclists (which includes the users of any  
4  
5 motorized two wheeled vehicle), cyclists, pedestrians, truck occupants, bus occupants and  
6  
7 others (in-line skaters, roller-skaters, and quad bike user).  
8  
9

10 This study is based on a registry that covers this fairly urbanized area of France between 1  
11  
12 January 1996 and 31 December 2008. We used the January 2011 safeguard of the Registry.  
13

14 The study period was divided into two six-year-periods, 1996-2001 and 2003-2008. The study  
15  
16 avoided 2002 because, in that year, the incidence of road traumas was intermediate between  
17  
18 two relatively homogeneous periods.  
19  
20  
21

## 22 23 **Statistical analysis** 24

25  
26 With regard to the first goal of this study, we calculated the incidence and fatality rates of SCI  
27  
28 during the periods 1996-2001 and 2003-2008. Adjustment for age was performed on the basis  
29  
30 of the population of the Rhône Département in 2002, which is the median year of the period  
31  
32 under study. In [a post hoc analysis](#), we then determined the road user types involved and the  
33  
34 other injuries that were significantly linked to SCI during each period. Statistical analysis was  
35  
36 performed using the SAS software.  $P < 0.05$  was deemed to be significant.  
37  
38  
39

## 40 41 **Results** 42

### 43 44 **Incidence and mortality rates** 45

46  
47 Although there has been a marked decrease (35%) in the incidence of casualties after a road  
48  
49 traffic crash and reductions of 22% in the incidence of MST and 33% in that of the most  
50  
51 severe injuries (AIS4+) ( $p < 0.001$ ), in the case of SCI, the incidence rate and number of  
52  
53 casualties has remained surprisingly stable (Table 1).  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 Spinal cord injuries accounted for a percentage of the most severe injuries that rose from  
4  
5 5.5% to 7.8%, but this difference does not achieve significance due to the small number of  
6  
7  
8 AIS 4+ spinal cord injuries.

9  
10 Between the two periods, the mortality of SCI casualties and the number who deceased during  
11  
12 prehospital and intrahospital care did not change, while the number and the mortality of the  
13  
14 most severely injured road crash casualties (AIS4+) decreased significantly (Table 2).

15  
16  
17 Consequently, the number of crash survivors with SCI fell.

18  
19  
20 The majority of fatalities occurred at the scene of the accident, although the proportion was  
21  
22 significantly lower in the later period (respectively 32/34 vs 31/42,  $p=0.04$ ).

### 23 24 **Demographic data**

25  
26 The sex ratios in the two periods for all the casualties in the Registry were 1.6 and 1.7  
27  
28 respectively. The sex ratios were much higher in the case of SCI: 4.9 and 3.8 for the two  
29  
30 periods, this reduction not being significant. As shown previously (1), the sex ratio for SCI  
31  
32 casualties increased in both periods with the severity of the injury and the use of a motorcycle  
33  
34 or a bicycle (data not shown).

35  
36  
37 The mean age of the casualties with spinal cord injuries was significantly higher in the more  
38  
39 recent period, rising from  $32 \pm 16$  to  $38 \pm 17$  years ( $p = 0.04$ ). However, this increase was  
40  
41 observed only among survivors (mean age from  $31 \pm 14$  to  $38 \pm 15$  years,  $p = 0.01$ ) not  
42  
43 fatalities, whose mean age did not change. Moreover, analysis of the distribution of age  
44  
45 classes revealed a significant decrease in the second period in the number of casualties aged  
46  
47 under 40 years while the number of casualties aged over 40 years increased ( $p = 0.02$ ). The  
48  
49 drop was particularly marked for the youngest age group (under 10 years) and teenagers.  
50  
51 (Figure 1A). The same phenomenon was observed for age-adjusted incidences (Figure 1B).

## Level of injury

Although the number and incidence of casualties with major spinal trauma, which includes fractures and dislocation of the spine, decreased significantly for injuries at all levels (cervical thoracic or lumbar), there was no decrease in spinal cord injuries at the cervical level (+5%) (Table 3). Moreover, the proportion of cervical spinal cord injuries with complete neurological deficit was significantly higher in the more recent period (45/52) than in the earlier period (33/47) ( $p < 0.05$ ).

## Characteristics of the accidents

Car users sustained significantly fewer SCI than other road users during the more recent period whatever their position in the car (driver or passenger) ( $p = 0.01$ ) (Figure 2). This result is also due to a 47% increase in SCI among motorcyclists ( $p = 0.02$ ) and a 77% increase in SCI among users of “green” modes, i.e. pedestrians and cyclists ( $p = 0.04$ ).

Regarding the type of journey, of the 87 casualties aged between 16 and 64 years for which information was available for both periods, 10 (12%) were injured in the course of a work-related journey. This rate was the same in both periods.

## Spinal cord injury severity and other associated injuries (AIS4+)

A significant difference was apparent between the two periods with regard to the severity of the SCI, the age of the casualties, the injury severity score and the number of severe associated injuries for each body region. Although the ISS was lower, the age of the casualties and the number of associated injuries was higher in the second period.

The severity of the spinal injuries (MAIS spine score) was slightly but not significantly higher in the second period (Table 4). Among the SCI fatalities, there was a significant decrease in

1  
2  
3 the median ISS score ( $p < 0.001$ ). Conversely, the ISS among survivors was higher in the  
4  
5 second period, but not significantly so.  
6  
7

8 The number of body regions with severe (AIS4+) injuries associated with SCI was  
9  
10 significantly higher (by 50%) in the later period and such injuries affected survivors more  
11  
12 often than the deceased ( $p = 0.007$ ). The highest incidence was for thoracic injuries, which  
13  
14 was significantly higher among survivors ( $p = 0.006$ ), followed by head injuries.  
15  
16  
17

### 18 **SCI among road users**

19 There were fewer spinal cord injuries among car occupants in the second period, at all levels  
20  
21 (cervical, thoracic, lumbar). In contrast, there were twice as many cervical injuries among the  
22  
23 group including motorcyclists, pedestrians and cyclists ( $p = 0.03$ ).  
24  
25  
26

27 Between the two periods, the numbers of casualties with severe injuries in other body regions  
28  
29 increased from 8 to 22 motorcyclists and from 5 to 10 “green” mode users whereas they  
30  
31 remained stable among car users (from 21 to 20).  
32  
33

34 To conduct a more detailed examination of motorcyclists, which was the subgroup which  
35  
36 exhibited the greatest increase in the more recent period, we attempted to describe the body  
37  
38 regions that sustained associated injuries at the time of the road crash. The motorcyclists  
39  
40 sustained significantly more thoracic injuries ( $p = 0.04$ ) in the more recent period, and these  
41  
42 increased in exactly the same proportion as fatalities ( $p = 0.04$ ) (Table 6). Similarly, the  
43  
44 number of head injuries more than doubled in the more recent period, without achieving  
45  
46 statistical significance.  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## **Discussion**

This study set out to observe changes in the incidence of spinal and spinal cord trauma and the associated survival rates in a given geographical zone during a fairly short period after a road crash. Like Pirouzmand (4), we found that the incidence not of only spinal trauma but of all trauma including the most severe, was lower in the more recent period. But, unlike that author, we did not find that this reduction was accompanied by a significant reduction in the incidence of spinal cord trauma. A large number of publications have described the changes in the survival of patients with an SCI, which, in developed countries, is not far from that of the general population (6,7). In a similar way, unlike Devivo et al., we found no improvement in immediate survival in the more recent period compared with the earlier one (5). This may be due to the fact that the research teams in question did not include SCI casualties who died soon after sustaining the injury who, in our view, represent almost 40% of the SCI casualties in the period 1997-2006 (1), with this figure remaining almost the same (38%) in the more recent period between 2003 and 2008 described in this paper.

### **Change in the incidence and mortality of spinal and spinal cord trauma**

Very surprisingly, and in marked contrast to the findings of Australian and American studies (3,5,10,11), when we compared a recent six year period with another six year period very slightly before it, we were unable to demonstrate any change in the incidence of spinal cord trauma in spite of the fact that the incidence of severe AIS4+ injuries sustained in road crashes fell by 35%. A possible explanation for this is that O'Connor's findings related to two six year periods between 1986 and 1997 (3) while our study relates to a more recent period that takes in the very marked strengthening in 2002 of the legislation with a view to improving road safety. Similarly, and in contrast to the data published by most authors, the fact that our study also includes clinical data on the 40% of SCI casualties who died before arrival at hospital (1) reveals that SCI mortality has been and is still underestimated and also

1  
2  
3 remains stable over time. The survival rates reported by authors are consequently too high  
4  
5 because inclusion in epidemiological studies is often based on hospital data which eliminates  
6  
7 SCI casualties who died at the scene of the crash before the arrival of the emergency services  
8  
9 or during the 24 hours immediately after injury (5,12). Some studies have applied exclusion  
10  
11 criteria of 30 days after the injury, and sometimes even longer (11,13-15). There has,  
12  
13 however, been no change in the early care administered to patients in our region in the two  
14  
15 periods in question, involving prehospital medical care and immediate transfer of all cases to  
16  
17 a trauma centre then to a neurosurgery department as soon as the patient's life-threatening  
18  
19 injuries have been stabilized. Nevertheless, we still observed that slightly more than half the  
20  
21 patients who were included in the second period died in the 30 days following the accident,  
22  
23 which is very much higher than the rate of 4% to 16% reported among SCI patients observed  
24  
25 during the acute phase (12,16,17) and the 36% reported during observation studies conducted  
26  
27 during rehabilitation and after (15). In our study, even if the incidence of early death among  
28  
29 SCI patients was non-significantly higher in the more recent period, the number of SCI  
30  
31 patients who died at the scene before the arrival of the emergency services has tended to fall  
32  
33 (31/32 vs 33/42;  $p = 0.048$ ). This is linked to a reduction in the severity of the injuries  
34  
35 sustained by all the road crash casualties in the registry, in particular in the case of those with  
36  
37 the most severe injuries (AIS4+) whose median ISS was lower in the second period, falling  
38  
39 from 30 (IQ<sub>25-75</sub>: 21-45) to 26 (IQ<sub>25-75</sub>: 20-36) ( $p < 0.001$ ). However, when we make a  
40  
41 comparison with other studies (3), although the ratio between the number of SCI and the  
42  
43 number of AIS4+ injuries is of the same order of magnitude (3‰ in the case of O'Connor  
44  
45 2006 (11) vs 1.4‰ for the entire period covered by our study), we have not observed any  
46  
47 improvement in the more recent period, and have even revealed a slight tendency for the  
48  
49 situation to deteriorate as the ratio between the number of SCI and the number of AIS4+  
50  
51 injuries increased slightly from 1.3‰ in the period 1996-2001 to 1.6‰ in the more recent  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 period. Similarly, we observed a ratio of SCI to MST of 1/12, which differs markedly from  
4  
5 that observed by other authors (from 1/3 to 1/6) (4,14). However, our recruitment was  
6  
7 complete and included patients with less severe spinal trauma than these two studies. The  
8  
9 differences can be explained by the way Pirouzmand's study included only patients with an  
10  
11 ISS of over 12, which applied to only 83% of our patients. In Baaj' study, hospitalization was  
12  
13 required, which was not necessarily the case for our patients. Thus, the selected populations in  
14  
15 the various studies that deal with the ratio of SCI toMST are different, and most of the time  
16  
17 cannot be easily compared (18).  
18  
19

20  
21  
22 Contrary to Tchvaloon et al. (14), we have thus observed a 56% increase in the number of  
23  
24 associated organ injuries per casualty, while like them, we have observed little difference  
25  
26 between the two periods in the levels of spinal and spinal cord deficit. However there is a  
27  
28 marked but non-significant upward trend (relative risk 1.23; IC<sub>95</sub> 0.99-1.53) in the number of  
29  
30 cervical injuries with complete as opposed to incomplete neurological deficit, which is  
31  
32 frequently associated with mortality (1,5,12).  
33  
34  
35  
36

### 37 **Road users and demography**

38  
39 We have identified several reasons for this absence of change in the mortality and incidence  
40  
41 of SCI: there has been a significant increase both in the proportion of SCI casualties who are  
42  
43 motorcyclists and the overall number of motorcyclist casualties, in contrast to all other  
44  
45 groups of road users (19). An analysis of the period 1996-2001 concurs with Australian data  
46  
47 for the period 1987-1995 which revealed that among SCI casualties, car occupants  
48  
49 predominated over motorcyclists (20). However, during the period 2003-2008, the ratio  
50  
51 between motorcyclists and car occupants was reversed in France, and motorcyclists are now  
52  
53 the dominant group among SCI casualties (34/23 in the more recent period vs 29/47 for car  
54  
55 users;  $p < 0.02$ ). This is mainly the outcome of a 50% reduction in SCI sustained in a road  
56  
57 crash among car occupants (OR 2.32). This change in the type of road users and, in particular,  
58  
59  
60

1  
2  
3 the increase in pedestrians and cyclists is associated with an increase in the proportion of  
4  
5 older people in the study as the number of SCI casualties falls in all age categories up to the  
6  
7 age of 40 years after which it increases. This has a non-negligible impact on the patient's  
8  
9 expected neurological recovery as it has been shown that recovery from a neurological deficit  
10  
11 and survival after SCI is better before 50 years of age than after (5,6,14,21,22).

12  
13  
14 Last, the change in road users has also led to a significant increase in the proportion of  
15  
16 complete or incomplete cervical spinal cord injuries compared with thoracic or lumbar  
17  
18 injuries. This increase in cervical injuries, which are the main cause of early mortality (1),  
19  
20 may have been partly responsible for our failure to observe a reduction in mortality among  
21  
22 SCI casualties in the more recent period (1,5,6).  
23  
24  
25  
26  
27

### 28 **Limits of the study**

29 One of the limits of the study is that it only considers spinal cord injuries that are caused by  
30  
31 road traffic accidents. This problem is counterbalanced by the internationally recognized  
32  
33 quality of the Registry as a result of its exhaustive coverage of a geographical zone. However,  
34  
35 one cannot exclude the possibility that some patients died later, after returning home or in  
36  
37 specialized centres, which would result in a slight underestimation of mortality. In western  
38  
39 countries, such an underestimation would probably be very small as, with the exception of  
40  
41 patients with cervical spinal injuries, once patients with spinal cord injuries have survived the  
42  
43 initial phase, their longevity is practically identical to that of other individuals belonging to  
44  
45 the same age group at the time of the accident (5,7,14). However, the fact that the population  
46  
47 of individuals with SCI for us to study has a marked tendency to become older may partly  
48  
49 explain the greater frequency of death after SCI.  
50  
51  
52  
53  
54

55 The blood alcohol status of casualties with SCI sustained in road crashes was not recorded,  
56  
57 but no further proof is required of the danger associated with intoxication of any type. The  
58  
59 principal purpose of the Registry is not to demonstrate the obvious but to identify new factors  
60

1  
2  
3 that society can act on. However, knowledge of the blood alcohol status could have informed  
4  
5 us about a need for a prevention policy that targets motorcyclists, whom we can now consider  
6  
7 to be the group most at risk of serious spinal and spinal cord injuries.  
8  
9

### 11 **Changes in behaviour on the road: the reduction in average speeds**

12 The fact that road safety policies have failed to have a visible effect on SCI raises a number of  
13  
14 issues. One hypothesis about the reduction in road accidents is that it is due to lower average  
15  
16 speeds. In France, studies have shown that the average speed of passenger cars fell by  
17  
18 approximately 5 km/h on all types of road between 2002 and 2008 (23). Likewise, in 2002,  
19  
20 the percentages of car and motorcycle users exceeding the speed limits by 10% were 35% and  
21  
22 55% respectively. These figures dropped to 10% and 35% respectively in 2008. In 2008,  
23  
24 motorcyclists still had higher mean speeds than motorists (86 vs 80 km.h<sup>-1</sup>).  
25  
26

27 The deployment of speed cameras since 2003 may have played a role in this reduction in  
28  
29 mean speeds, not only near the cameras but also at a distance from them (24). However,  
30  
31 although the introduction of speed cameras and the changes in the legislation have played a  
32  
33 significant role in reducing severe road trauma (casualties with AIS4+ injuries), the increase  
34  
35 in traffic density may also have increased SCI. Greater traffic density may have led to a  
36  
37 change in the types of vehicle used, with drivers attempting to avoid congestion by switching  
38  
39 to a motorcycle because of its ability to move more freely in urban areas. Although the  
40  
41 information on work-related accidents is frequently absent from the Registry, we failed to  
42  
43 observe an increase in the rate of work-related accidents. Moreover, the other items of data  
44  
45 (period of the year, time of day of the accident) have remained unchanged which gives the  
46  
47 impression that motorcycle crashes still mostly occur during leisure trips, as reported in the  
48  
49 majority of studies (25).  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Conclusion

The findings of this study confirm the quality of the primary prevention policies that target children, young adults or their parents, revealing a major reduction in crashes with SCI in the period between 2003 and 2008. However, quite unexpectedly in view of the fact that road trauma was approximately 35% lower in the more recent period and spinal trauma has fallen by 22%, we have not observed any significant reduction in the incidence and mortality of SCI sustained in road traffic accidents. Even more worryingly, we have observed an increase in multiple trauma and a deterioration in clinical outcomes for these casualties linked to a change in the road users that are affected and the ageing of the groups sustaining SCI. These findings confirm that although the incidence of road trauma is in general tending to fall in developed countries, the situation needs to be monitored continually. This study highlights the fact that if research that focuses on road casualties with SCI is conducted, in particular with a view to improving neuroprotection, it should, of course, target patients with a spinal cord injury, but also take account of the fact that the patients tend to be older than in the past and more frequently have associated multiple trauma.

Findings with regard to improvements in road safety are not always uniform for all injuries and there is now a need to strengthen preventive measures in relation to the populations that are most at risk of sustaining SCI in a road crash, be they motorcyclists, cyclists or pedestrians.

## ***Conflict of interest :***

Any of the authors declares having conflict of interest about this study.

## References

- 1- Lieutaud T, Ndiaye A, Frost F, Chiron M, Registry Group (2010). A 10-year population survey of spinal trauma and spinal cord injuries after road accidents in the Rhône area. *J Neurotrauma*. 27, 1101-7.
- 2- McDonald JW, Sadowsky C (2002). Spinal-cord injury. *Lancet*. 359, 417-25.
- 3- O'Connor PJ (2005). Survival after spinal cord injury in Australia. *Arch Phys Med Rehabil*. 86, 37-47.
- 4- Pirouzmand F (2010). Epidemiological trends of spine and spinal cord injuries in the largest Canadian adult trauma center from 1986 to 2006. *J Neurosurg Spine*. 12, 131-40.
- 5- DeVivo MJ, Krause JS, Lammertse DP (1999). Recent trends in mortality and causes of death among persons with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 80, 1411-9.
- 6- Catz A, Thaleisnik M, Fishel B, Ronen J, Spasser R, Fredman B, Shabtay E, Gepstein R (2002). Survival following spinal cord injury in Israel. *Spinal Cord*. 40, 595-8.
- 7- van den Berg ME, Castellote JM, Mahillo-Fernandez I, de Pedro-Cuesta J (2010). Incidence of spinal cord injury worldwide: a systematic review. *Neuroepidemiology*. 34, 184-92;
- 8- Laumon B, Martin JL, Collet P, Chiron M, Verney MP, Ndiaye A (1997). A French road accident trauma registry: first results. In: AAAM, editor. 41<sup>st</sup> annual AAAM conference; 10-11 november 1997, Orlando, Florida: AAAM. 127-37.
- 9- Association for the Advancement of Automotive Medicine. (1990). The Abbreviated Injury Scale, 1990 Revision. Des Plaines, IL: Association for the Advancement of Automotive Medicine.
- 10- Saunders LL, Selassie AW, Hill EG, Nicholas JS, Varma AK, Lackland DT, Patel SJ (2009). Traumatic spinal cord injury mortality, 1981-1998. *J Trauma*. 66, 184-90.

- 1  
2  
3 11- O'Connor PJ (2006). Trends in spinal cord injury. *Accid Anal Prev.* 38, 71-7.  
4  
5  
6 12- Ankarath S, Giannoudis PV, Barlow I, Bellamy MC, Matthews SJ, Smith RM (2002).  
7  
8 Injury patterns associated with mortality following motorcycle crashes. *Injury.* 33,  
9  
10 473-7.  
11  
12 13- Thurman DJ, Burnett CL, Beaudoin DE, Jeppson L, Sniezek JE (1995). Risk factors  
13  
14 and mechanisms of occurrence in motor vehicle-related spinal cord injuries: Utah.  
15  
16 *Accid Anal Prev.* 27, 411-5.  
17  
18 14- Tchvaloon E, Front L, Gelernter I, Ronen J, Bluvshstein V, Catz A (2008). Survival,  
19  
20 neurological recovery and morbidity after spinal cord injuries following road accidents  
21  
22 in Israel. *Spinal Cord.* 46, 145-9.  
23  
24  
25 15- Lidal IB, Snekkevik H, Aamodt G, Hjeltnes N, Biering-Sørensen F, Stanghelle JK  
26  
27 (2007). Mortality after spinal cord injury in Norway. *J Rehabil Med.* 39, 145-51.  
28  
29  
30 16- Kattail D, Furlan JC, Fehlings MG (2009). Epidemiology and clinical outcomes of  
31  
32 acute spine trauma and spinal cord injury: experience from a specialized spine trauma  
33  
34 center in Canada in comparison with a large national registry. *J Trauma.* 67, 936-43.  
35  
36  
37 17- Macias CA, Rosengart MR, Puyana JC, Linde-Zwirble WT, Smith W, Peitzman AB,  
38  
39 Angus DC (2009). The effects of trauma center care, admission volume, and surgical  
40  
41 volume on paralysis after traumatic spinal cord injury. *Ann Surg.* 249, 10-7.  
42  
43  
44 18- [Baaj AA, Uribe JS, Nichols TA, Theodore N, Crawford NR, Sonntag VK, Vale FL](#)  
45  
46 [\(2010\). Health care burden of cervical spine fractures in the United States: analysis of](#)  
47  
48 [a nationwide database over a 10-year period. J Neurosurg Spine. 13:61-6.](#)  
49  
50  
51  
52 19- Gadegbeku B, Chiron M, Ndiaye A, Laumon B (2010). Road traffic casualties: what  
53  
54 trends? Rhône Registry, France, 1996-2008. *BEH.* 12,47.  
55  
56 <http://www.invs.sante.fr/beh/> Document in French.  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 20- O'Connor P (2002). Injury to the spinal cord in motor vehicle traffic crashes. *Accid*  
4  
5 *Anal Prev.* 34, 477-85.  
6  
7  
8 21- Penrod LE, Hegde SK, Ditunno JF Jr (1990). Age effect on prognosis for functional  
9  
10 recovery in acute, traumatic central cord syndrome. *Arch Phys Med Rehabil.* 71, 963-  
11  
12 8.  
13  
14  
15 22- Roth EJ, Lovell L, Heinemann AW, Lee MY, Yarkony GM (1992). The older adult  
16  
17 with a spinal cord injury. *Paraplegia.* 30, 520-6.  
18  
19  
20 23- ONISR 2009; [http://www.securiteroutiere.gouv.fr/IMG/pdf/26-](http://www.securiteroutiere.gouv.fr/IMG/pdf/26-observatoire_vitesses_3Q2010_final_cle25e114.pdf)  
21  
22 [observatoire\\_vitesses\\_3Q2010\\_final\\_cle25e114.pdf](http://www.securiteroutiere.gouv.fr/IMG/pdf/26-observatoire_vitesses_3Q2010_final_cle25e114.pdf); Document in French.  
23  
24  
25 24- Wilson C, Willis C, Hendrikz JK, Le Brocque R, Bellamy N (2010). Speed cameras  
26  
27 for the prevention of road traffic injuries and deaths. *Cochrane Database Syst Rev.* 10,  
28  
29 11: CD004607.  
30  
31  
32 25- Farmer CM, Williams AF (2005). Temporal factors in motor vehicle crash deaths. *Inj*  
33  
34 *Prev.* 11, 18-23.  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Acknowledgments

We wish to thank the following people for having participated in the data collection and data recording, within the Rhône road trauma registry Association (ARVAC, president E Javouhey), and within the INRETS-UMRESTTE research unit (B Laumon, scientific adviser and A Ndiaye, medical coordinator) : Ait Idir T, Ait Si Selmi T, Alloatti D, Amoros E, Andrillat M, Artru F, Asencio Y, Assossou I, Auzaneau F, Bagès-Limoges F, Bagou G, Balogh C, Banssillon G, Banssillon V, Barnier N, Barth X, Basset M, Bec JF, Bejui J, Bel JC, Bérard E, Bérard J, Bernard JC, Berthet N, Bertrand JC, Besson L, Biot B, Biot V, Blanc C, Blanchard J, Boeuf C, Boisson D, Bonjean M, Bost J, Bouchedor C, Bouletreau P, Boyer M., Boyer V, Breda Y, Brilland R, Bussery S, Cabet N, Caillot L, Caillot JL, Cannamela A, Caregnato B, Carre M, Catala Y, Chagnon PY, Chambost M, Chantran C, Chardon P, Charnay P, Chatelain P, Chattard S, Chauvin F, Chavane H, Chazot G, Chettouane I, Chevreton N, Chevillon E, Chevillon S, Chiron M, Chotel P, Cochard P, Combe C, Contamin B, Coppard E, Cot T, Crettenet Z, Cristini A, Cunin V, Dailler F, Dal Gobbo B, David JS, De Angelis MP, Decourt L, Delfosse A, Demazière J, Deruty R, Desjardins G, Devaux J, Dohin B, Drouet A, Emonet A, Escarmant J, Evrard AS, Eyssette M, Fallavier L, Fanton L, Felten D, Feuglet P, Fifis N, Figura J, Fisher G, Fischer LP, Flocard B, Floret D, Fournier G, Fraisse P, Fredenucci JF, Freidel M, Fuster P, Gadegbeku B, Galin L, Gaillard P, Gallon M, Garnier N, Garzanti A, Gaussorgues P, Gautheron V, Genevriev M, Gibaud F, Gillet Y, Gilly F, Goubsky A, Granger M, Grattard P, Gueniaud PY, Guenet C, Guérin AC, Guignand M, Guillaumée F, Haddak M, Hamel D, Haouas T, Heckel T, Herzberg G, Ho-Van-Truc P, Jacquemard C, Joffre T, Kohler R, Lablanche C, Lafont S, Lagier C, Lapierre B, Laplace MC, La Rosa C, Laurent R, Lebel M, Leblay G, Le-Xuan I, Lieutaud T, Lille R, Linné M, Lucas R, Machin B, Maiello E, Malicier D, Mangola B, Marduel YN, Marie-Catherine M, Martin JL, Martin YN, Martinand G, Marty F, Mazouzi S, Menard B, Messikh C, Meyer F, Meyrand S, Molard S, Monneuse O, Morel-Chevillet E, Mioulet E, Minjaud F, Mollet C, Monnet J, Moyen B, Neidhart JP, Ngandu E, Ny S, Ould T, Paget P, Paillot JC, Paris D, Patay B, Pauget P, Peillon D, Perrin G, Perrin-Blondeau D, Petit P, Piriou V, Piton JL, Plantier M, Pornon P, Pramayon C, Quelard B, Rakaa A, Raquin L, Remy C, Rezig M, Ricard A, Richard A, Rigal F, Robert D, Rode G, Romanet JP, Rongieras F, Roset C, Rousson A, Roussouli P, Roux H, Ruhl C, Salamand J, Salord F, Sametzky P, Sayegh K, Sayous P, Sbraire N, Scappaticci N, Schiele P, Schneider M, Simonet C, Sindou M, Soldner R, Soudain M, Stagnara J, Stamm D, Suc B, Supernant K, Taesch MC, Tasseau F, Tell L, Thomas M, Tilhet-Coartet S, Tissot E, Toukou JC, Trifot M, Tronc F, Vallee B, Vallet G, Vancuyck A, Vergnes I, Verney MP, Voiglio EJ, Vourey G, Vuillard J, Westphal M, Willemen L.

Table 1:

	<i>1996-2001</i>		<i>2003-2008</i>		Trend	p
Population (N)	9,451,938		9,959,966			
	N	Incidence /1,000,000	N	Incidence /1,000,000		
All casualties	64312	6804.1	50746	5095.0	-35%	< 0.0001
All MAIS 4+ casualties	1520	160.8	1045	104.9	-33%	< 0.0001
Major Spinal Trauma	1 003	106.1	828	83.1	-22%	< 0.0001
Spinal Cord Injury	83	8.8	82	8.2	-6%	NS

Table 2 –

	<i>1996-2001</i>	<i>2003-2008</i>	Trend	p
	n=83	n=82		
Incidence of SCI/1,000,000	8.8	8.2	-6%	NS
Number of fatalities with SCI (fatality rate in brackets)	34 (41%)	42 (51%)	+25%	NS
Mortality with SCI/1,000,000	3.6	4.2	+17%	NS
Survival rate with SCI/1,000,000	5.2	4.0	-23%	NS

Table 3

	<i>1996-2001</i>		<i>2003-2008</i>		Trend	P
Population (No of inhabitants)	9,451,938		9,959,966			
	No	Incidence /1,000,000	No	Incidence /1,000,000		
<b>Major Spinal Trauma</b>	<b>1003</b>	<b>106,1</b>	<b>828</b>	<b>83,1</b>	<b>-22%</b>	<b>&lt;0.001</b>
Cervical	387	40,9	346	34,7	-15%	<b>0,03</b>
Thoracic	315	33,3	295	29,6	-11%	NS
Lumbar	375	39,7	280	28,1	-29%	<0.001
<b>Spinal Cord Injury</b>	<b>83</b>	<b>8,8</b>	<b>82</b>	<b>8,2</b>	<b>-6%</b>	NS
Cervical	47	5,0	52	5,2	<b>+5%</b>	NS
Thoracic	32	3,4	28	2,8	-17%	NS
Lumbar	6	0,6	2	0,2	-67%	NS

Table 4

	<i>1996-2001</i>		<i>2003-2008</i>	
	<b>N=83</b>		<b>N=82</b>	
	Fatalities N=34	Survivors N=49	Fatalities N=42	Survivors n=40
MAIS spine = 4	-	12	-	9
MAIS spine = 5	17	37	28	31
MAIS spine = 6	17	-	14	-
Mean age ( $\pm$ SD)	36 $\pm$ 17	31 $\pm$ 14	39 $\pm$ 18	38 $\pm$ 15 <sup>£</sup>
Injury Severity Score				
Median (IQ <sub>25-75</sub> : interquartile 25-75)	75 (59-75)	27 (25-34)	57 (44-75)	30 (25-42)
Min-Max	27-75	16-59	26-75	17-59
Number of severely injured casualties (MAIS 4+) for each body region <sup>\$</sup>				
Head	13	3	18	8
Face	1	-	2	-
Neck	1	-	-	-
Thorax	22	4	22	17
Abdomen	3	3	9	2

Table 5

	<i>1996-2001</i>		<i>2003-2008</i>		
	<b>n=83</b>		<b>n=82</b>		
	Fatalities n=34	Survivors N=49	Fatalities N=42	Survivors n=40	
Car					
	Cervical	19	12	14	8
	Thoracic	1	12	1	5
	Lumbar	-	3	1	-
Two-wheeled motor vehicle					
	Cervical	6	4	13	4
	Thoracic	-	12	4	12
	Lumbar	-	1	1	-
Pedestrian					
	Cervical	1	1	3	2
	Thoracic	3	1	2	2
	Lumbar	-	-	-	-
Bicycle					
	Cervical	1	1	2	3
	Thoracic	-	1	0	3
	Lumbar	-	-	-	-
<b>Other (Truck, van, tractor)</b>		3	1	1	2

Table 6

Number of casualties with AIS4+ injuries for each zone	1996-2001		2003-2008	
	N=23		n=34	
	Fatalities	Survivors	Fatalities	Survivors
	n=6	n=17	n=18	n=16
Head	3	1	6	3
Face			1	-
Thorax	5	1	9	9
Abdomen	1	1	2	1

## Legends

### Table 1:

*Average population of the Rhône département, numbers and incidences in the two periods of all casualties, severe casualties (AIS4+), major spinal trauma and spinal cord injuries. Although the population was higher in the second period, the numbers and incidences of casualties, particularly for the most severe injuries (AIS4+) and major spinal trauma, decreased significantly but the numbers and incidences of spinal cord injury remained constant.*

### Table 2:

*With regard to spinal cord injury sustained in a road crash, there was no significant change between the two periods in the incidence, the number of fatalities, the fatality rates, mortality rates or survival rates.*

### Table 3:

*See text*

### Table 4:

*Spinal cord injuries and overall severity of associated injuries in the two studied periods  
£ indicates statistically significant difference vs survivors in the period 1996-2001  
\$ indicates a casualty may have injuries to several body regions  
MAIS is the Maximum Abbreviated Injury Score;  
SD is the Standard Deviation*

### Table 5:

*Casualties with spinal cord injuries sustained in a road traffic accident: types of road users, vital status and level of spinal injury in the two studied periods. Cervical injuries increased significantly among motorcyclists, cyclists and pedestrians.*

**Table 6:** *Number of SCI casualties with other associated AIS4+ injuries among motorcyclists. The number of fatalities and individuals with severe injuries to the head or thorax was higher in the second period.*

### Figure 1:

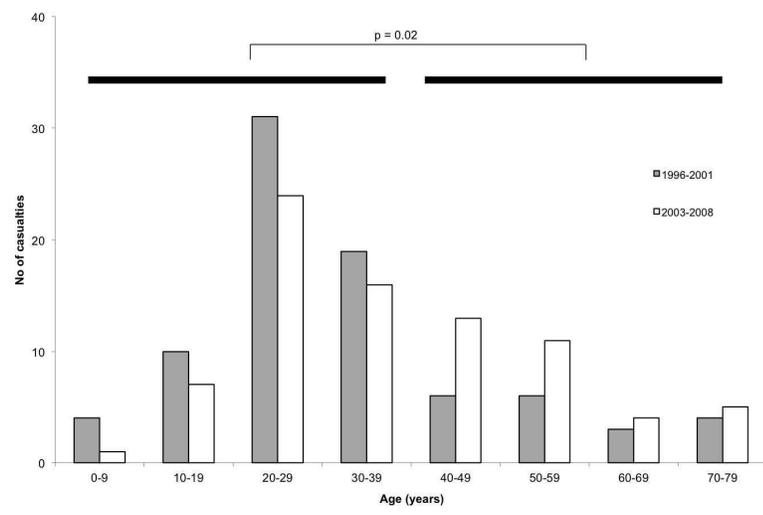
- A- *Age distribution of casualties with Spinal Cord Injuries due to a road traffic accident in the two studied periods: the number of casualties aged over 40 years with an SCI sustained in a road crash was significantly higher in the more recent period between 2003 and 2008 (light coloured bar) than in the earlier period between 1996 and 2001 (dark bar).*
- B- *Age-adjusted incidence distribution between the two studied periods of Spinal Cord Injury casualties after a road crash. Adjustment was made on the Rhone Département population on the year 2002 which is the median year of the study. Note that the distribution shapes in absolute figures (A) or in age-adjusted incidence (B) were not different.*

*Age distribution for casualties with Spinal Cord Injuries due to a road traffic accident in the two studied periods: the number of casualties aged over 40 years with an SCI sustained in a road crash was significantly higher in the more recent period between 2003 and 2008 (light coloured bar) than in the earlier period between 1996 and 2001 (dark bar).*

### Figure 2:

*Distribution of types of road user among casualties with spinal cord injuries sustained in a road traffic accident in the two studied periods. There were significantly fewer car occupants in the more recent period but an increased number of motorcyclists (in particular), pedestrians and cyclists.*

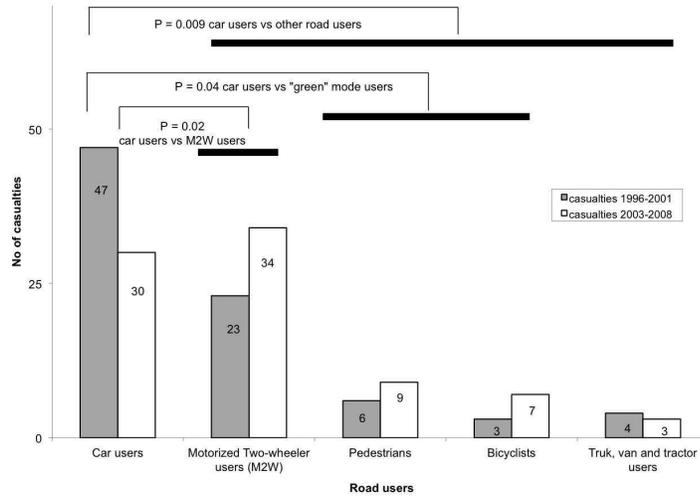
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



297x209mm (150 x 150 DPI)

Review

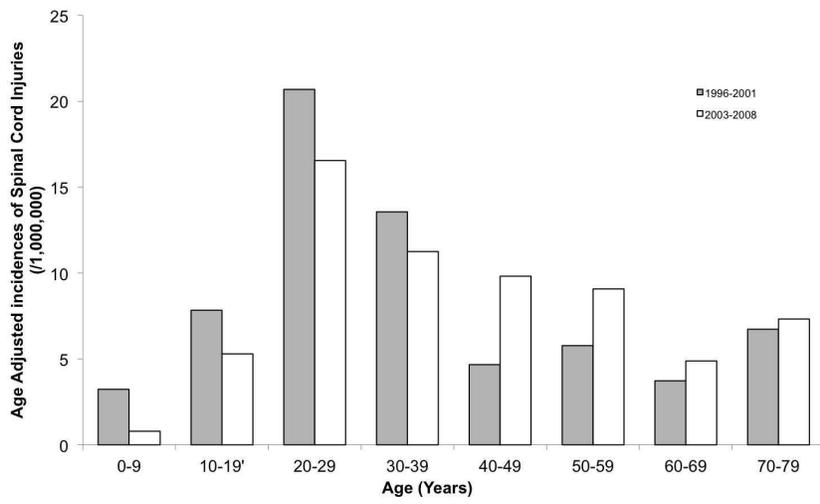
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



297x209mm (150 x 150 DPI)

Review

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



297x209mm (150 x 150 DPI)

Review

Dans ce second travail, les explications apportées par l'analyse comparées, sur ces 2 périodes d'observation des données du registre, sont les suivantes :

- 1- il existe, dans la période récente, une augmentation significative du nombre de conducteurs de 2 roues motorisés dans le groupe des patients victimes de TMD. Cette augmentation s'accompagne d'une réduction du nombre de conducteurs de voitures particulières. De même il existe également une augmentation du nombre de piétons et cyclistes.
- 2- Spontanément, cette augmentation pourrait faire penser que les plus jeunes, souvent conducteurs de mobylettes ou scooters seraient en cause dans ce groupe. De façon surprenante, toutes les tranches d'âge jusqu'à 40 ans ont diminué en chiffre absolu et en incidences pondérées sur l'âge, dans la période récente.
- 3- Enfin, l'augmentation même non significative de la mortalité s'explique par le fait que le Registre s'attache à relever les bilans lésionnels de tous les patients vivants ou morts impliqués dans un accident de la circulation contrairement à la plupart des autres études portant sur les TMD (Pirouzmand 2010).

Nous tenons donc des explications quant à l'échec de l'inclusion des patients dans l'étude TETRAM.

## **ETUDE 3 : EFFETS DE L'EPO-RH DANS LE TRAUMATISME CRANIEN. RATIONNEL CHEZ L'HOMME ET ETUDES PRECLINIQUES CHEZ L'ANIMAL**

---

### **5. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES : TRAUMATISMES CRANIENS CHEZ L'HOMME**

---

Considérant notre incapacité à inclure des patients victimes de TMD dans un protocole quand l'incidence de la pathologie était de 9/1 000 000 dans la région du Rhône, nous avons pris l'option de nous concentrer sur la traumatologie crânienne grave, qui a une incidence 20 fois supérieure aux TMD dans le Registre du Rhône (Gadegbeku 2010, Javouhey 2006). De plus, compte tenu du temps passé à construire une étude clinique, nous avons opté pour la réalisation d'études précliniques afin d'obtenir des résultats tangibles et de développer des collaborations de façon plus rapides.

Nous reprenons l'épidémiologie du TC, les moyens de diagnostic clinique et non clinique les plus fréquemment employés, les séquelles attendues et mesurables dans le contexte du traumatisme crânien chez l'homme. Puis, dans la partie suivante, nous exposerons les différents modèles expérimentaux de traumatisme crânien actuellement réalisés, les modalités de diagnostic employées tant sur le plan des indicateurs secondaires que des indicateurs comportementaux, si possible, corolaires chez l'animal des troubles neurologiques observés chez l'homme. Ceci nous a permis de choisir des stratégies d'exploration les plus proches de celles réalisées chez l'homme. Nous finirons par la présentation des études publiées ou en cours de publication auxquelles nous avons participé qui avaient comme objectif de promouvoir des stratégies neuroprotectrices à partir de l'Epo-rh.

#### **5.1. *Définition d'un traumatisme crânien (TC)***

La définition d'un TC nécessite l'existence d'un mécanisme lésionnel engendrant un choc direct ou indirect (décélération) imprimé sur le crâne. Ce choc direct peut être pénétrant ou non, le choc indirect peut induire des dommages internes par des effets de cisaillement et de compression/décompression sans qu'il existe de dommage externe visible.

La gravité du TC se définit cliniquement par le score de Glasgow (GCS)(Teasdale 1974) (tableau 3). Ce score est subdivisé en 3 classes en fonction de l'examen clinique et il prédit également assez bien le devenir fonctionnel des patients.

Ouverture des yeux	Réponse verbale	Meilleure réponse motrice*
<input type="radio"/> Spontanée (4) <input type="radio"/> A la demande (3) <input type="radio"/> A la douleur (2) <input type="radio"/> Aucune (1)	<input type="radio"/> Orientée (5) <input type="radio"/> Confuse (4) <input type="radio"/> Inappropriée (3) <input type="radio"/> Incompréhensible (2) <input type="radio"/> Aucune (1)	<input type="radio"/> Obéit à la demande verbale (6) <input type="radio"/> Orientée à la douleur (5) <input type="radio"/> Evitement non adapté (4) <input type="radio"/> Décortication (flexion à la douleur) (3) <input type="radio"/> Décérébration (extension à la douleur) (2) <input type="radio"/> Aucune (1)
<b>Total Glasgow=</b>		

Tableau 3 : Echelle de Glasgow (Teasdale 1974)

- A- Le traumatisme crânien grave ou sévère : se définit par un TC accompagné d'un score de Glasgow inférieur ou égal à 8.
- B- Le traumatisme crânien modéré : se définit comme un TC accompagné d'un GCS compris entre 9 et 13.
- C- Le traumatisme crânien mineur (mild TBI) se définit comme un TC accompagné d'un GCS  $\geq$  13. Néanmoins, cette définition est très limitée et a été complétée par d'autres échelles de mesure du TC mineur.

Ainsi, le congrès américain de rééducation délimite les critères d'inclusion du TC mineur quand au moins un des points suivants est présent :

- 1- toute période de perte de connaissance de moins de 30 minutes associée à un GCS de 13 à 15 après cette période de perte de connaissance
- 2- Toute période d'amnésie couvrant un événement précédant ou suivant le TC avec une amnésie post-traumatique inférieure à 24h
- 3- Toute altération de l'état de conscience au moment de l'accident (désorientation, confusion, impression cotonneuse)

L'American Academy of Neurology a proposé une autre gradation des TC mineurs en 3 catégories

### Score de Traumatisme Crânien mineur

- |          |   |
|----------|---|
| Grade 1: | - Confusion transitoire<br>- Pas de perte de connaissance<br>- Symptômes confusionnels disparaissant dans les 15 minutes        |
| Grade 2: | - Confusion transitoire<br>- Pas de perte de connaissance<br>- Symptômes confusionnels ne disparaissant pas dans les 15 minutes |
| Grade 3: | - Perte de connaissance quelque soit sa durée (< 30 min)  |

([http://www.aan.com/professionals/practice/guidelines/pda/Concussion\\_sports.pdf](http://www.aan.com/professionals/practice/guidelines/pda/Concussion_sports.pdf))

Tableau 4 : Score de traumatisme crânien de l'AAN

Ces classifications autorisent une plus grande finesse d'analyse des patients avec des GCS élevés puisque le syndrome confusionnel est plus détaillé en particulier dans la durée des symptômes. Cependant, et compte tenu des éléments manquants très fréquemment dans les dossiers cliniques, Malec et col (2007) ont proposé une classification de la traumatologie crânienne basée sur la probabilité du TC à partir des données recueillies dans les dossiers. En effet, plus le traumatisme est sévère, plus le dossier clinique sera complet et le classement correctement fait. Il en est ainsi du décès par exemple. Par contre, pour les TC de moindre sévérité, le GCS est manquant dans près de 75% des cas. Ainsi en posant la probabilité du TC comme « certaine » pour les traumatismes crâniens graves ou modérés, « probable » pour les traumatisme mineurs et « possible » pour les TC symptomatiques, Malec et col peuvent classer tous les TC selon la classification de la Mayo Clinic (voir tableau 5). Etant donné les incertitudes quant aux résultats du scanner en particulier quand il n'est pas réalisé, les auteurs estiment que la sensibilité de cette échelle est de 89% avec une spécificité de 98% pour, *a priori*, classer correctement les TC graves ou modérés à partir des données des dossiers cliniques. Cela revient à dire que sont mal classés environ 10% des patients n'ayant pas les symptômes cliniques requis pour avoir un TC certain (modéré ou sévère) mais qui, s'ils avaient passé un scanner, aurait montré des lésions intra-crâniennes.

## Score de sévérité du TC de la Mayo Clinic (Malec 2007)

- A- TC Modéré à sévère (Certain) – un ou plusieurs critères
  - a. Mort en relation directe avec le TC
  - b. Perte de connaissance > 30 minutes
  - c. GCS < 13 au cours des 24 premières heures sans lien avec d'autres causes que le TC
  - d. Un ou plusieurs des éléments identifiés par l'imagerie cérébrale
    - i. Hématome intracérébral
    - ii. Hématome sous- ou extra-dural
    - iii. Contusion cérébrale
    - iv. Contusion hémorragique
    - v. Traumatisme cranio-cérébral pénétrant
    - vi. Hémorragie sous-arachnoïdienne post-traumatique
    - vii. Traumatisme du tronc cérébral
- B- TC mineur (probable) – un ou plusieurs critères
  - a. Perte de connaissance momentanée (< 30 min)
  - b. Amnésie antérograde post-traumatique < 24h
  - c. Fracture du crâne (dure mère intacte)
- C- TC symptomatique (possible) – un ou plusieurs critères
  - a. Confusion mentale
  - b. Troubles de l'équilibre
  - c. Sensation d'ébriété
  - d. Troubles de la vision transitoire
  - e. Symptômes neurologiques focaux
  - f. Céphalées
  - g. Nausées

Tableau 5 : Score de sévérité des TC de la Mayo Clinic

### 5.2. *Epidémiologie*

Le traumatisme crânien (TC) est un problème de santé publique bien plus répandu que le TMD puisqu'il concerne en France environ 150 000 nouvelles personnes par an. Aux USA, environ 5,3 millions de personnes (2% de la population) vivent avec des séquelles de TC (Thurman 1999). Aux USA, le TC est la 2<sup>e</sup> cause de pathologie neurologique avec une prévalence annuelle de 101/1 000 000 juste après les AVC (183/1 000 000), très loin devant les traumatismes médullaires (5,4/1 000 000)(Hirtz 2007).

Comme partout dans le monde, l'incidence des traumatismes crâniens, graves ou non, a diminué. Aux USA, entre 1980 et 1995, l'incidence d'hospitalisation pour TC est passé de 198 à 98/1 000 000 essentiellement en raison des modifications des pratiques de la prise en charge des TC mineurs (Thurman 1999). Les auteurs montraient que l'incidence d'hospitalisation pour TC avait chuté de 66% chez les 5-14 ans, alors qu'elle n'avait diminué que de 9% chez les sujets de plus de 65 ans. Or, d'une façon générale, l'incidence des pathologies traumatiques est souvent calculée en fonction des patients hospitalisés. Il est donc difficile sur des données de ce type de fonder des conclusions épidémiologiques.

En Nouvelle Zélande et en Australie, l'incidence du TC au cours des années 1980 était de 200/100 000 habitants. Elle n'avait pas changé au cours de l'année 2000 (Myburgh 2008). La part de la traumatologie routière s'élevait à 61%, alors que les chutes chez les sujets âgés représentaient 25% des cas de TC hospitalisé en réanimation. Parmi ceux-ci, 57% étaient des TC graves avec GCS < 8 (Myburgh 2008).

Localement, en exploitant les données du Registre des accidents du Rhône, qui n'enregistre que les traumatismes crâniens induit par la traumatologie routière, Javouhey et collaborateurs ont montré que les incidences respectives des traumatismes crâniens mineurs, modérés et sévères étaient de 74,7, 47,5 et 13,7 pour 100 000 habitants (Javouhey 2006). Cette analyse a porté sur les années 1996-2001 et ne concernait, comme toutes les données du Registre, que les accidents de la circulation ayant impliqué au moins un véhicule en déplacement (incluant les rollers, skate board, etc...).

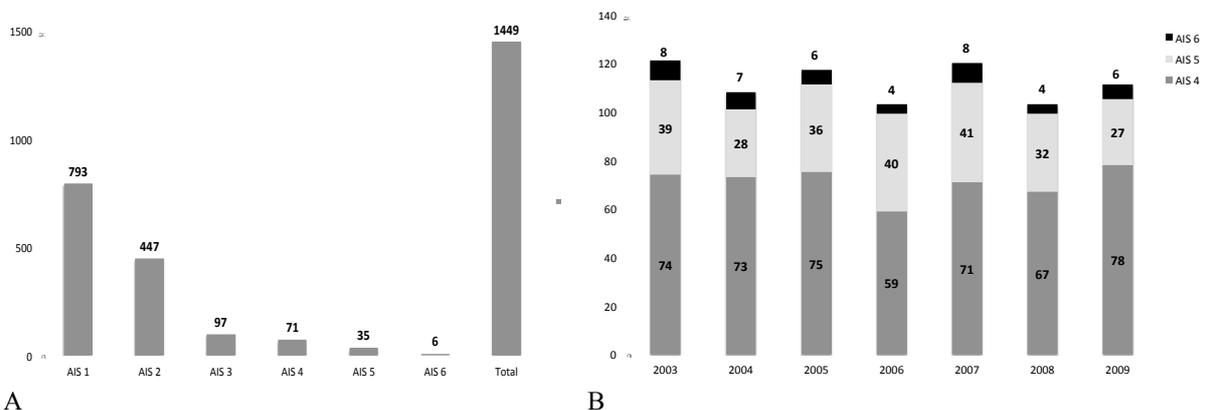


Figure 3 : (A) Moyennes annuelles et (B) nombres de patients avec un traumatisme crânien (source : Registre du département du Rhône, années 2003-2009 selon la classe de gravité AIS (AIS1 étant une plaie du scalp, AIS 6 étant une plaie cranio-cérébrale délabrante non compatible avec la vie) ; (B) nombres de victimes de TC graves (AIS 4-5-6)(AIS 1990).

Toujours à partir du Registre du Rhône, Gadegbeku a montré récemment que l'incidence des décès avec atteinte cérébrale grave secondaire à un accident de la route avait diminué de 50% alors que l'incidence des atteintes cérébrales avec séquelles lourdes n'avait diminué que de 15% (Gadegbeku 2010). Les raisons pour lesquelles cette chute spectaculaire des traumatismes crâniens à l'origine d'un décès ou de séquelles lourdes était observée n'ont pas été analysées. Les auteurs montraient que l'incidence de la traumatologie grave des patients âgés de moins de 10 ans après un accident de la route était en chute libre (Gadegbeku 2010). En Ile de France, l'incidence des TC graves (GCS < 8) est de 3/100 000 pour les années 2005-2006, avec une mortalité à 28 jours de 45% (Tazarourte, 2008).

En Norvège, l'analyse des hospitalisations pour TC montrait une diminution globale de l'incidence de celles des TC mais, parmi celles-ci, une forte augmentation de la proportion de

sujets âgés en raison de chutes, proportion qui aggravait le pronostic global de la cohorte (Andelic 2008).

Tous ces chiffres recourent l'incidence de TC du Registre où nous retrouvons 642 victimes d'accidents de la circulation avec TC grave (AIS4-5) entre les années 2003 et 2008 (soit 112 par an en moyenne). L'incidence des TC liés à la traumatologie routière représentant environ 50% de tous les TC, on peut escompter un total d'environ 200 à 250 TC graves par an pris en charge par les différents SAMU de Lyon pour une population d'environ 1 800 000 habitants. Le nombre de TC mineurs (AIS 1-2) après accident de la circulation se situe à un niveau environ 10 fois plus élevé, correspondant à environ 2400 TC mineurs sur la région lyonnaise, toutes causes confondues.

### ***5.3. Evaluation de la gravité du Traumatisme Crânien***

La gravité du traumatisme crânien est estimée par le score de Glasgow (Glasgow Coma Scale-GCS)(1) (tableau 4). Cette estimation de l'atteinte neurologique en terme de fonctions cérébrales supérieures mais aussi de fonctions vitales, internationalement reconnue est effectuée par un médecin et sert également dans le suivi et la surveillance en réanimation par les infirmiers et infirmières. Elle est complétée par quelques éléments anamnétiques fondée sur la durée de la perte de connaissance et sur le durée de l'amnésie post-traumatique qui permettent de différencier entre traumatismes crâniens mineurs, modérés et sévères.

L'Abbreviated Injury Scale (AIS)(AIS 1990) est une méthode de mesure fondée sur une lésion anatomique observable soit cliniquement (GCS) soit à l'aide d'examen d'une imagerie cérébrale. La mortalité des victimes d'accident de la route ayant au moins un traumatisme crânien est de 100% pour les scores AIS6 et diminue à 54% pour ceux ayant un score lésionnel AIS4 (Gadegbeku 2010). D'une façon générale, la mortalité des accidents de la route est précoce, et pour 80 à 90% des morts, le décès survient sur les lieux de l'accident avec au moins une lésion AIS 4 (Ndiaye 2009).

### ***5.4. Les méthodes d'évaluation non clinique de la gravité d'un traumatisme crânien***

Nous ne verrons dans cette partie que les méthodes d'évaluation non cliniques exportables chez le rat et que nous avons exploité dans notre travail chez l'animal

#### 5.4.1. Scanner cérébral

Le scanner, incontournable, est le plus couramment employé parmi les examens radiologiques réalisés en présence d'un patient ayant subi un traumatisme crânien avec perte de connaissance.

Les données de la « Trauma Data Bank » ont permis de développer un score de gravité pour le scanner (Marshall 1991, Marshall 1992) avec une bonne observance inter et intra-observateurs (Vos 2001) et une capacité à améliorer le rendement de la sélection des patients dans des études cliniques (Vos 2001).

(Score scannographique de la Trauma Coma Data Bank)

Score	Definition
Atteinte Diffuse I	Pas de pathologie intracrânienne visible.
Atteinte Diffuse II	Citernes présentes avec un déplacement de la ligne médiane (DLM) de 0-5 mm, avec/sans lésion intracrânienne d'un volume < 25 mL
Atteinte Diffuse III	Citernes comprimées ou absentes avec un DLM de 0–5 mm, avec/sans lésion intracrânienne d'un volume < 25 mL
Atteinte Diffuse IV	DLM > 5mm, avec/sans lésion intracrânienne d'un volume < 25 mL
Lésion évacuée (V)	Toute lésion intracrânienne évacuée chirurgicalement
Lésion non évacuée (VI)	Toute lésion intracrânienne > 25mL non évacuée par chirurgie

Tableau 6 : score de sévérité scannographique (Marshall et al., 1991; Marshall et al., 1992, Vos 2001).

Cependant, sa capacité résolutive est limitée et depuis l'apparition des IRM, il est sans commune mesure dépassé, mais reste très accessible.

#### 5.4.2. L'IRM cérébrale classique, l'IRM en tenseur de diffusion, l'IRM fonctionnelle

##### 5.4.2.1. L'IRM cérébrale

Malgré l'ancienneté relative du scanner, il est maintenant communément admis que la capacité à mettre en évidence des anomalies morphologiques au niveau de l'encéphale d'un patient ayant eu un TC à l'aide scanner cérébral est d'autant plus pris en défaut que les symptômes cliniques sont peu importants (McDonald 2011). L'IRM ou imagerie par résonance magnétique est apparue progressivement comme une nouvelle méthode plus sensible et spécifique pour mettre en évidence des lésions anatomiques chez les patients ayant subi un TC mineur à modéré mais aussi chez les patients ayant subi un TC grave (Newcombe 2011). En effet, les capacités de résolution spatiale de l'IRM peuvent être considérées 10 fois

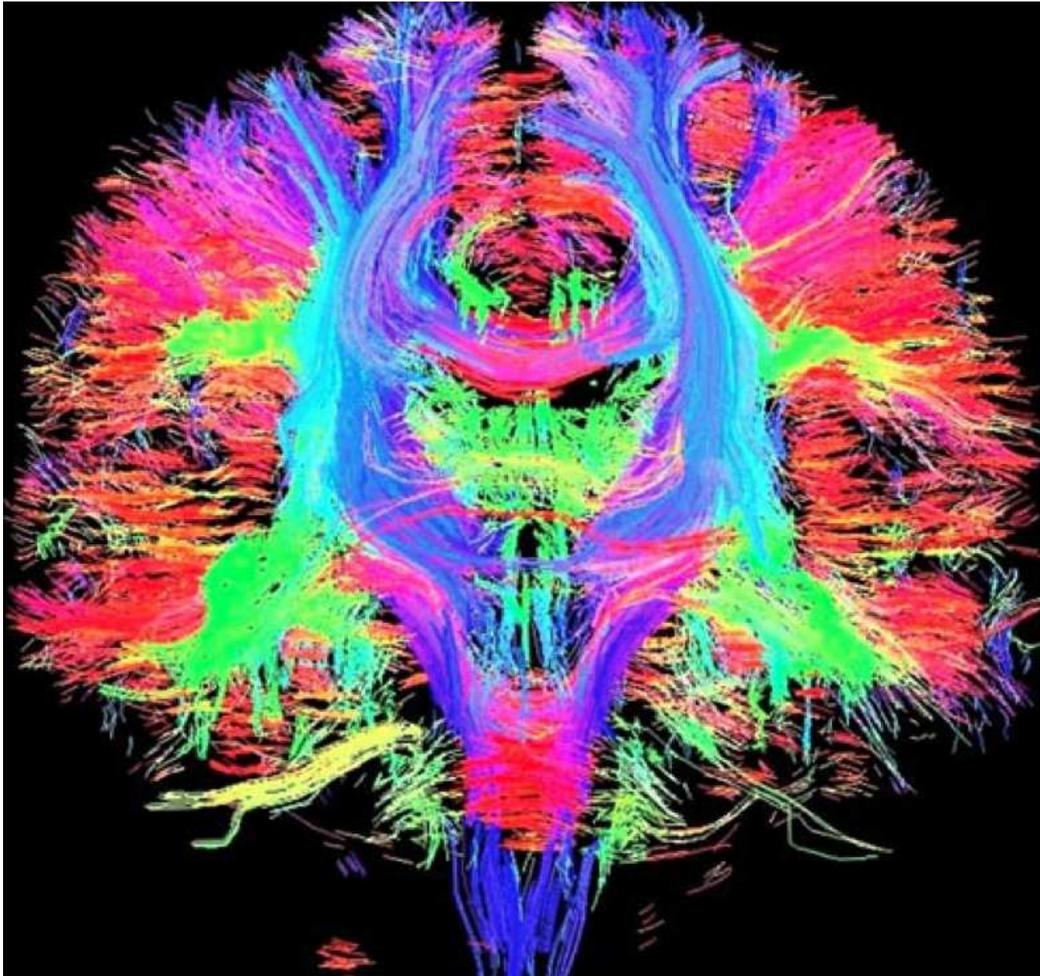
supérieures à celles du scanner conventionnel. De plus, la mise en écho-spin des molécules d'eau permet une nette amélioration de la visualisation des structures anatomiques par rapport au scanner que ce soit pour des hématomes intracérébraux, surtout quand ceux-ci sont de petites tailles, mais également pour d'autres lésions.

En général, les résultats fournis par l'IRM sont informatifs et complémentaires en fonction du moment auquel est réalisé l'examen. Cette imagerie peut être acquise aux différentes phases post-traumatiques : i) à la phase aiguë (au cours des 24 premières heures suivant le TC), ii) à la phase subaiguë immédiate, (entre J1 et J13 post-TC), iii) à la phase sub-aiguë (J14-J20) ou iv) à la phase chronique commençant après J21 suivant le TC. Certaines lésions initiales vont disparaître (œdème, hémorragies), d'autres vont apparaître au cours du séjour hospitalier (conséquences de l'hypertension intracrânienne, de l'hypoxie, de l'hypotension artérielle, ...). Le plus souvent, l'IRM morphologique comprend des séquences non injectées pondérées en T1, en T2, en FLAIR (Axial Fluid Attenuated Inversion Recovery), T2\* et parfois 3D-T1. Les séquences en FLAIR et T2 permettent de visualiser l'œdème cérébral, les contusions, les hématomes, les hernies cérébrales, l'hémorragie sous arachnoïdienne post-traumatique ou l'hydrocéphalie. Les séquences en T2\* permettent de visualiser les lésions axonales diffuses révélées par des multiples micro-hémorragies au sein de la substance blanche. Le nombre de lésions visualisées en FLAIR ou T2\* est inversement corrélée avec le GOS (Glasgow Outcome Scale, voir tableau 7).

L'analyse volumétrique de certaines parties du cerveau (cortex préfrontal, cortex cingulaire, hippocampe et thalamus) a montré qu'elle était bien associée aux troubles de la mémorisation après TC et aux capacités de récupération en service de rééducation fonctionnelle (Strangman 2010).

Le principe de l'imagerie en Tenseur de Diffusion (IRM DTI) utilise les mouvements de l'eau soumise à des champs magnétiques différents non colinéaires. Ceci permet de définir des vecteurs de déplacement des protons. L'organisation du tissu est définie par les barrières qu'opposent les structures tissulaires aux mouvements de l'eau, restreignant les déplacements des protons. Considérant des normes de déplacement évaluées chez les sujets sains, on peut les comparer aux résultats obtenus pour des zones pathologiques. L'enrichissement des bases de données est donc essentiel à la compréhension actuelle et future de ces lésions.

Grace aux cartes des principaux mouvements de l'eau, on peut dessiner des vecteurs préférentiels de déplacement de l'eau soumise aux différents champs magnétiques ce qui permet de définir les cartographies ou des tractographies de ces déplacements dans plusieurs directions vectorielles principales.



(D'après Tshibanda, 2010)

*Figure 4 : Chaque vecteur directionnel de déplacement de l'eau est affecté à une couleur*

Pendant très longtemps, l'examen anatomopathologique du cerveau a constitué la clé de la compréhension des phénomènes pathologiques cérébraux après agression cérébrale. L'arrivée de moyens radiologiques a permis de comprendre d'abord les phénomènes indirects (compression, déplacement de structures et du parenchyme) puis de façon directe (scanner) la pathologie intra-cranienne ou intra-cérébrale. Le renforcement des contrastes par l'utilisation de produits injectables sensibilisait encore les qualités diagnostiques de ces appareils mais c'est surtout l'apparition de l'IRM, par son pouvoir de résolution supérieure, qui a permis un saut qualitatif dans la visualisation du cerveau et la compréhension de phénomènes qui passaient inaperçus au scanner. Néanmoins, les temps d'acquisition et la présence de l'aimant interférant avec tout constituant ferromagnétique interdisent souvent le recours à l'IRM à la phase aiguë de la prise en charge de ces patients.

#### 5.4.2.2. Principes de l'IRM et de l'IRM en tenseur de diffusion

L'IRM utilise le signal émis par la mise en polarité des protons soumis à une variation de champ magnétique centré sur une région cible. Beaucoup de molécules contiennent des protons, mais la majorité du signal est émis par les protons contenus dans l'eau qui constitue 70% de la masse de l'organisme des mammifères. L'ensemble des événements mesurés par l'IRM constitue une mesure de la densité et de l'organisation de l'eau dans les tissus et l'IRM fournira une mesure directe ou indirecte de phénomènes biologiques et/ou pathologiques. Cette mesure, pour l'IRM conventionnelle sera exprimée en échelle de gris. Ainsi, ce qui fait la pertinence et la performance de l'IRM comparativement au scanner en particulier, c'est à dire la précision de la coupe qui est de l'ordre de 10 µm alors qu'un scanner a un pouvoir discriminant 100 fois inférieur, est contrebalancé par la difficulté de mettre en évidence les contrastes de gris.

Pour favoriser cette discrimination entre les niveaux de gris, au moins 3 paramètres sont contrôlés :

- Le temps de relaxation (TR) qui est le temps d'acquisition du signal correspondant au temps entre la fin de l'application du champ magnétique et le début de la nouvelle application du champ magnétique.
- Le temps d'écho (TE) qui correspond au temps d'exposition au champ magnétique
- b qui est le champ magnétique appliqué différent du champ magnétique B0 de base (de l'ordre de 1,5 Tesla), qui lui dépend des caractéristiques constructeurs de la machine.

Ces trois paramètres permettent la genèse d'un signal S qui varie en fonction des paramètres TR, TE et b. Ceux ci permettent de définir les séquences T1, T2 et D (diffusion) qui pondèrent les signaux S.

Le coefficient de diffusion D nécessite l'acquisition de 2 signaux différents selon l'application de deux champs magnétiques différents (b1 et b2), en plus du champ magnétique de base.

D est calculé selon la formule suivante :

$$D = -\ln (S2/S1) / (b2-b1)$$

Plus D sera élevé, plus le signal sera de qualité.

### 5.4.2.3. Principes du Tenseur de Diffusion

L'analyse en Tenseur de Diffusion autorise l'appréciation de plusieurs paramètres principaux : l'isotropisme (ou moyenne de la diffusion), la fraction d'anisotropie (vecteur principal pondéré par les autres vecteurs cardinaux), les diffusions radiale et axiale et permet d'interpréter ou d'approcher, par les mouvements de l'eau, la composition, l'architecture du tissu et l'orientation des fibres axonales. Il est plus facile d'analyser la substance blanche, organisée en faisceaux que la substance grise, plus anarchique.

Pour évaluer l'organisation (ou la désorganisation) d'un tissu, l'utilisation des équations de tenseur de diffusion est requise. Cette équation implique l'usage d'une variation de l'application de champ magnétique dans au moins 3 directions cardinales générant 6 vecteurs de diffusion de l'eau.

La résultante des mouvements de protons pourra être schématisée comme une ellipse dont les vecteurs principaux ( $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$ ) définiront les contours de l'ellipse par l'équation suivante :

$$(\lambda_1 - \lambda_2)^2 + (\lambda_1 - \lambda_3)^2 + (\lambda_2 - \lambda_3)^2.$$

Si la diffusion est isotrope, ( $L_1 = L_2 = L_3$ ), cette équation a comme résultante 0.

La fraction d'anisotropie (FA ou Relative Anisotropy) permet d'apprécier l'organisation relative à l'aide de différentes formules mathématiques. Celle que nous avons choisi s'écrit sous la forme (Pour les modalités d'acquisition et d'analyse de l'IRM, cf Annexe 4) :

$$FA = \sqrt{\frac{3}{2}} \sqrt{\frac{(D_{xx} - ADC_m)^2 + (D_{yy} - ADC_m)^2 + (D_{zz} - ADC_m)^2}{D_{xx}^2 + D_{yy}^2 + D_{zz}^2}}$$

Plus la diffusion est homogène, c'est à dire proche d'une sphère, plus la fraction d'anisotropie sera proche de 0.

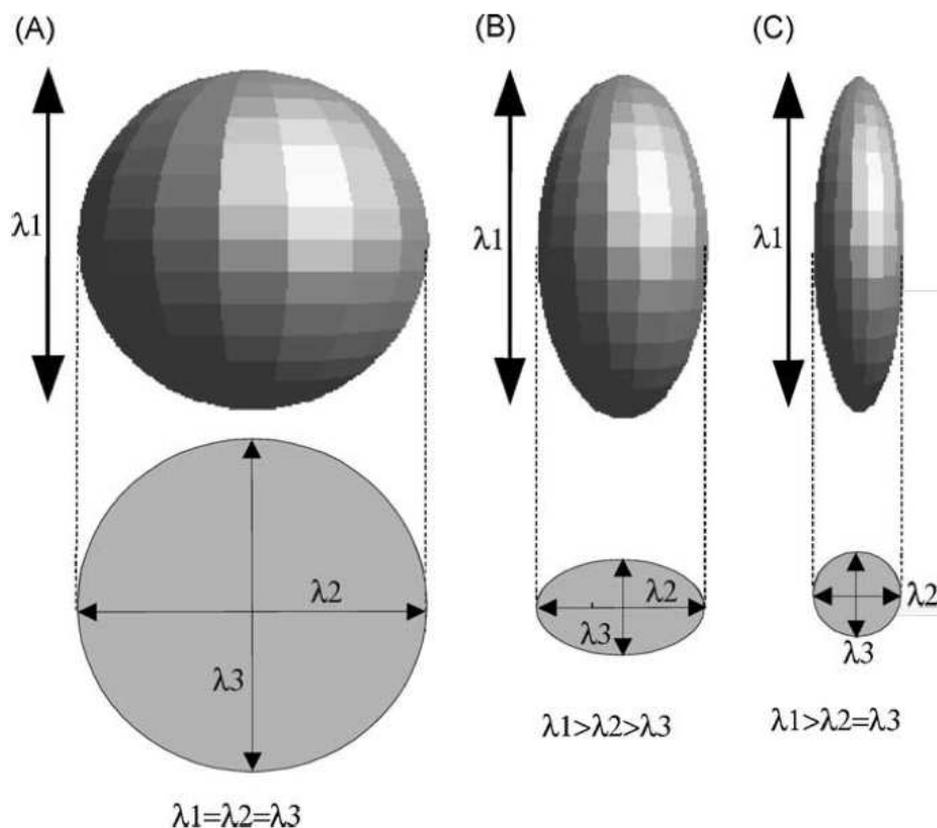


Figure 5 : principes de compréhension des calculs des vecteurs des tenseurs de diffusion (d'après Mamata 2004)

L'information fournie par l'acquisition en DTI est une information sur les mouvements d'eau et sur leur relation avec l'anatomie du tissu. On peut distinguer 3 types d'organisation de l'eau (figure 5):

- une organisation sphérique ou isotrope, où tous les vecteurs analysés ont la même taille. La moyenne des vecteurs est égale à chacun des vecteurs. L'inflammation ou l'œdème peuvent créer des zones où les vecteurs d'acquisition tendent vers cette isotropie.
- Une organisation en cigare ou tube où un vecteur est largement dominant sur les autres. On parle d'organisation anisotrope. Une élévation de l'anisotropie fait supposer une architecture de fibres organisées, par exemple axonale dans le cerveau.
- Une organisation intermédiaire entre ces 2 schémas.

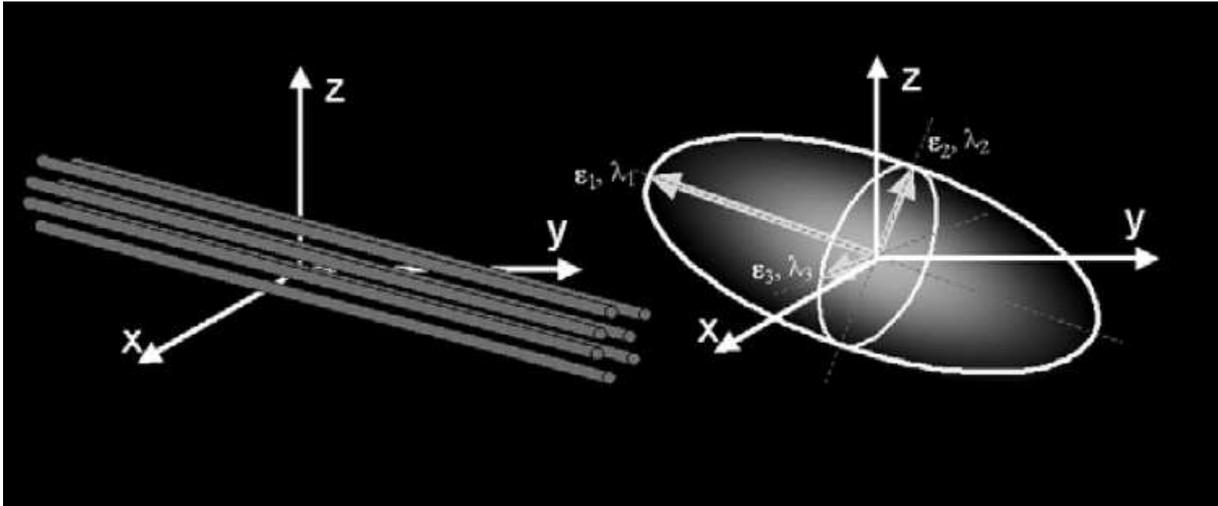


Figure 6 : principe de compréhension de la Fraction d'anisotropie (D'après Alexander 2007)

Le signal acquis au niveau de chaque pixel correspond à la somme des signaux de chaque molécule d'eau comprise dans ce pixel obtenus au cours de l'exposition au champ magnétique.

Classiquement, le cortex révèle une FA relativement basse ( $FA < 20\%$ ) non pas parce qu'il n'existe pas de prolongement neuritique aux neurones mais parce que l'organisation des prolongements de ces neurones n'est pas homogène dans l'espace des voxels analysés. Les tissus ayant la FA la plus élevée sont le corps calleux et la capsule interne ( $\approx 70\%$ ) alors que le thalamus a une valeur plus basse ( $\approx 30\%$ ) (Huisman 2004).

Chez le volontaire sain, la Fraction d'Anisotropie (FA est la plus élevée dans le corps calleux, suivie par les faisceaux cortico-spinaux, la substance blanche médullaire et la capsule interne, toutes à des valeurs de FA supérieure à 60% (Mamata 2004).

Une augmentation de la FA n'est pas immédiatement due à une modification cellulaire ou neuritique, mais peut être en rapport avec une modification architecturale plus complexe.

A l'opposé, une diminution de la FA s'observera dans trois cas de figures : i) soit quand le vecteur principal de la FA diminuera (diminution de la diffusion axiale) ii) soit quand les vecteurs transverses au vecteur principal augmenteront (augmentation de la diffusion radiale ou axiale), iii) soit, et le plus fréquemment, quand il existe une combinaison des deux phénomènes.

Dans la corrélation anatomo-clinique en cours d'établissement chez le petit animal, une démyélinisation est plutôt observée en cas de diminution de la diffusion axiale alors que les

ruptures axonales sont plutôt observées en cas d'augmentation de la diffusion radiale (McDonald 2007).

De plus en plus d'études tendent à prouver les corrélations existantes entre le devenir des patients et les scores précoces, cliniques ou radiologiques.

Pour plus de détails, on se référera à l'article d'Alexander et col (2007).

#### 5.4.3. Résultats chez l'homme

La substance blanche permet au cerveau d'intégrer les informations en provenance de toutes les zones cérébrales. Ainsi, des lésions dans les faisceaux de la substance blanche qui relient entre elles les différentes zones corticales impliquées dans le traitement des informations physiques sensorielles, somatiques et sociales ont les mêmes conséquences qu'une atteinte de chacune de ces zones prises séparément (Chanraud 2008).

La plupart des études réalisées à l'aide des nouvelles modalités d'IRM-DTI dans un contexte de TC chez l'homme, l'ont été pour mettre en évidence des lésions inaccessibles par les autres moyens conventionnels d'imagerie et prédire le déficit neurologique attendu. En général les collectifs étudiés sont faibles (le plus souvent :  $N < 40$ ), les comparaisons sont effectuées sur un groupe de volontaires appariés sur l'âge et le sexe et parfois le côté dominant et les groupes de TC souvent hétérogènes. Tant la spectro-MR que l'IRM en DTI montrent une supériorité non seulement sur le scanner cérébral mais aussi sur l'IRM conventionnelle (McDonald 2011, Mamere 2009). L'IRM conventionnelle à l'aide d'une analyse volumétrique de l'hippocampe permet également une bonne prédiction des troubles de la mémoire chez les TC graves (Christidi 2011). Tous ces examens effectués dans un contexte de TC graves montrent des altérations massives en particulier situées au niveau du tronc cérébral qui est une partie du cerveau difficile à analyser par le scanner cérébral (Tollard, 2009). Si les lésions oedémateuses ou hémorragiques de plus de 2 mm sont analysables par l'IRM conventionnelle, il n'en est rien des lésions liées à la destruction des tissus, en particulier quand l'imagerie est acquise à une phase relativement tardive où les lésions hémorragiques ou oedémateuses ont été résorbées. L'IRM devient donc un examen dynamique à obtenir précocement et à répéter dans le temps pour voir disparaître ou apparaître des lésions initialement non identifiées ou au contraire cicatrisées.

Après un TC grave ou modéré survenant au décours d'un accident de la route ou de sport, Caeyenberghs et col ont montré que des lésions du corps calleux étaient étroitement associées à des troubles de la coordination motrice bimanuelle ou de changement de tâches semi-

complexes chez des patients atteints de TC graves ou modérés (GCS de  $8 \pm 3,7$ ) (Caeyenberghs 2011). Alors qu'ils retrouvaient de très nombreuses régions avec des troubles de la FA ou de l'ADC dans un groupe de 16 patients avec TC modéré à grave (GCS médian = 7), Salmond et col, quant à eux, ont montré une corrélation positive entre ADC et troubles de l'apprentissage et de la mémoire mais une absence de corrélation entre FA et déclin cognitif (Salmond 2006). D'autres ont montré que les régions d'intérêt renvoyaient des signaux montrant que le pronostic neurologique était corrélé à une augmentation de l'ADC (Newcombe 2011) ou à une diminution de la FA après TC grave (Tollard 2009). La sévérité et l'extension des lésions identifiées par l'IRM-DTI est bien corrélée à la gravité initiale du TC. Chez les TC graves ou modérés, des anomalies en DTI sont retrouvées dans les 13 régions d'intérêt analysées contre 3 seulement pour les patients ayant un TC mineur (Kraus 2007). Kraus propose même un score d'intégrité (ou densité) de substance blanche, dont il rapporte une corrélation avec les déficits neuropsychologiques à distance sur un collectif de 39 patients sur des IRM réalisées en moyenne 107 mois (près de 9 ans) après le TC (Kraus 2007).

Nous disposons de beaucoup moins d'études en IRM-DTI chez l'homme après TC mineur. Chez 63 vétérans de la guerre d'Irak ou d'Afghanistan suivi pendant 12 mois et ayant eu une IRM-DTI dans les 14 jours après un TC mineur secondaire à un blast associé à un autre mécanisme lésionnel (perte de connaissance < 30 min, Amnésie Post-Traumatique < 24h), tous les scanners et les IRM conventionnels étaient normaux (McDonald 2011). Parmi ces vétérans, 18 avaient des troubles multifocaux à l'IRM-DTI et 20 avaient une lésion uni-focale définie par une variation de plus de 2 déviations standard (DS) des paramètres du tenseur de diffusion dans une des 17 sous-régions cérébrales analysées. La population contrôle était composée de vétérans hospitalisés mais n'ayant pas subi de TC ni de lésion secondairement à un blast. Enfin, le suivi par IRM-DTI montrait que certains vecteurs du tenseur de diffusion étaient significativement plus bas dans le groupe des patients avec TC comparativement d'une part à l'examen initial et d'autre part à ceux du groupe sans TC (McDonald 2011). Mais dans cette dernière étude, aucune mesure neurocomportementale n'a été entreprise pour croiser les données de l'IRM en DTI avec les troubles cognitifs précoces ou chroniques générés par un TC mineur. Et surtout, une partie non négligeable des patients (40%) n'avait aucune modification significative de l'IRM-DTI. De même, après exposition à un blast, dans un contexte de TC mineur ou modéré pour lequel une imagerie avait été acquise dans les 42 mois suivant le TC, Levin et col ont retrouvé des anomalies IRM chez 5 des 37 patients, sans

corrélation avec la durée ou l'intensité des troubles cliniques initiaux. La durée moyenne de la perte de connaissance était inférieure à 30 minutes, et 3 patients seulement présentaient une durée d'amnésie post-traumatique supérieure à 24h (Levin 2010). Dans une étude de suivi à 2 et 12 mois après un TC grave ou modéré (GCS 7-13), alors que les tests neuropsychologiques comprenant des tests de mémoire et de fonctions exécutives avaient tendance à s'améliorer dans le temps, Bendlin et al ont observé une diminution de la FA et une augmentation de l'ADC entre une IRM précoce et une seconde IRM plus tardivement obtenue après le TC (Bendlin 2008). Chez 22 traumatisés crâniens mineurs sans blast, Mayer et al ont retrouvé une élévation des FA et une diminution de la diffusion radiale dans plusieurs régions de la substance blanche, comparativement à 22 témoins. La corrélation entre les troubles de l'attention et la FA au niveau de l'hémisphère droit était significative (Mayer 2010). Enfin, contrairement à McDonald, ces auteurs ne retrouvaient plus aucun paramètre d'IRM-DTI différant entre les 2 groupes 3 à 5 mois plus tard.

D'autres ont corrélé des altérations des FA et des ADC du splenium du corps calleux avec le GCS et le score de Rankin quand l'acquisition a été réalisée dans les 7 jours (Huisman 2004). Les microhémorragies, facilement identifiables en T2\*, sous évaluent le traumatisme quand ces microhémorragies sont comparées aux anomalies révélées par les calculs vectoriels du DTI (Kinnunen 2010).

Globalement les régions les plus touchées semblent être le corps calleux, la capsule interne, les faisceaux longitudinaux supérieurs, le cingulum pour les TC sévères (Xu 2007), la capsule interne et le corps calleux pour les TC modérés, les faisceaux cortico-spinaux et les faisceaux longitudinaux supérieurs pour les TC mineurs (Kumar 2009). Les corrélations avec les troubles cognitifs doivent être basées sur de multiples tests car dépendantes des troubles observés (Kumar 2009). D'autres régions comme les radiations coronaires antérieures ont été pointées comme régulièrement atteintes à l'IRM-DTI réalisée un mois après un TC mineur (Niogi 2008). Ces auteurs notaient que le nombre de lésions identifiées dans la substance blanche était mieux corrélée au temps de réaction que le nombre de micro-hémorragies (Niogi 2008). On pourra se référer à l'étude de Maller résumant les conséquences et les corrélations entre les lésions retrouvées en DTI et les troubles cognitifs présentés. Mais comme dit précédemment, les collectifs étudiés sont le plus souvent inférieurs à 30 personnes rendant les conclusions limitées par rapport à l'épidémie silencieuse de TC mineurs (Maller 2010). Enfin, d'autres troubles cognitifs ou émotionnels n'ont souvent pas été analysés et devraient voir leur incidence revue à la hausse par la sensibilité que procure l'IRM-DTI dans la mise en

évidence de l'extension des lésions y compris après TC mineur. Ainsi des troubles dépressifs qui sont actuellement en voie d'être reconnus comme faisant partie des séquelles des TC et dont les caractéristiques anatomiques post-TC sont envisagées, pour l'instant avec des moyens limités en regard de l'évolution dans le temps (Maller 2010).

L'ensemble des données présentées ici, suggère que des lésions discrètes peuvent être visualisées par IRM-DTI chez l'homme après un TC mineur à condition que l'examen soit réalisé le plus précocement possible. Mais ceci pourrait faire exploser les comptes de la sécurité sociale...

Cependant, ces éléments vont tous à l'encontre de ce qui est formellement recommandé à savoir qu'un scanner cérébral ne doit être effectué qu'en cas de TC avec perte de connaissance (PC) ou Amnésie Post-Traumatique (APT) à condition qu'elle soit accompagnée d'au moins un signe post-contusionnel de gravité: céphalées, vomissement, syndrome confusionnel, épilepsie, GCS < 15, déficit neurologique ou coagulopathie associée (Stiell 2005, Smits 2005).

Les recommandations de niveau B concernent les cas où, en l'absence de PC, après un TC, il existe des signes évoquant une fracture de la base, des signes anamnestiques de gravité (éjection d'un véhicule, projection de piétons, chute de plus de 3m), un âge avancé (> 65 ans), et/ou des signes cliniques de sévérité (céphalées durables, vomissements, déficit neurologique) (Jagoda 2008). Il y a 3 ans, aucune recommandation de réalisation d'une IRM dans le contexte de la prise en charge du TC mineur n'était validée (Jagoda 2008).

#### **5.4.4. Autres modalités d'IRM**

D'autres modalités diagnostiques d'IRM ont été employées. Elles sont toutes basées sur les variations de disponibilité des protons contenue dans certaines molécules qui entrent en résonance en fonction de la programmation de la durée de relaxation et d'écho

##### **5.4.4.1. L'IRM métabolique ou Spectro-MR**

En prolongeant la durée de l'écho, on peut mesurer les résonances de la choline, la créatine, le N-acetyl-aspartate, et le lactate. La créatine reflèterait plutôt le métabolisme aérobie, le lactate, le métabolisme anaérobie. Plusieurs études retrouvent des corrélations entre les ratios Choline/créatine, NAA/créatine avec le GCS (Tshibanda 2010). La présence de lactate est

retrouvée à des concentrations élevées en cas de contusion (Tollard 2009). L'association de plusieurs modalités d'IRM comme DTI et MRS pour les TC graves sans éveil après arrêt des sédations permet d'améliorer encore le pouvoir discriminant entre les TC graves d'évolution favorable (sortie de coma) par rapport à ceux ayant une évolution défavorable (décès, coma végétatif, état pauci-relationnel) (Tollard 2009).

#### 5.4.4.2. L'IRM fonctionnelle

De même, très prometteuses pour l'évaluation des capacités cognitives des sujets en état pauci-relationnel ou dans l'évaluation des séquelles post-traumatiques (), nous n'avons pas analysé les études actuelles sur l'IRM fonctionnelle. Certains auteurs ont pu montrer la séparation possible des circuits du langage entre l'articulation de sons et la compréhension plus subtiles du langage répartis entre un circuit dorsal et un circuit plus ventral (Saur PNAS 2008). Coleman et al ont montré que l'IRMf permettait d'identifier un traitement de l'information auditive chez certains patients considérés comme étant en état végétatif post-traumatique ou ischémique (Coleman 2009)

Mais, n'ayant pas du tout abordé ces techniques dans notre travail expérimental sur le traumatisme crânien expérimental, nous avons choisi de ne pas développer davantage ces autres modalités d'examen disponibles avec l'IRM.

#### 5.4.4.3. Autres modalités d'imageries

Nous n'avons volontairement pas parlé des autres modalités d'imagerie comme le PET-SCAN (Scanner par émission de positron), qui peuvent donner des informations de débit sanguin cérébral ou de métabolisme local en fonction du radiomarqueur injecté tout comme certaines modalités d'IRM.

### 5.5. *Séquelles neurologiques*

#### 5.5.1. **Mesure des séquelles**

L'échelle de Glasgow du devenir clinique a été fondée pour permettre de comparer à terme les effets des pathologies, de leur présentation, de leur prise en charge sur l'évolution clinique à distance. Elle est connue sous le nom de GOS (Glasgow outcome scale). Une échelle, dérivée de la GOS a été développée plus récemment (Teasdale Wilson 1998). Etendant le score non pas à 5 mais 8 catégories, elle permet de mieux apprécier l'évolution clinique des patients les moins graves en rajoutant un score « haut » ou « bas » aux 3 catégories les plus élevées du GOS.

## GOS ou Glasgow Outcome Scale et GOS étendue (GOSe)

Glasgow Outcome Scale (GOS) ou échelle de suivi de Glasgow	<i>GOSe</i>
1 = Mort	
2 = Etat végétatif : rythme veille sommeil, pas de suivi oculaire	
3 = Handicap sévère : conscient, totalement dépendant	<i>H/B</i>
4 = Handicap modéré : déficit neurologique ou intellectuel, indépendant	<i>H/B</i>
5 = Bonne récupération : indépendant sans ou avec déficit neurologique modéré	<i>H/B</i>

Tableau 7 : Glasgow Outcome Scale ou échelle de devenir de Glasgow (D'après Jennet (1981) et Pettigrew (1988) ; GOSe : GOS étendu, H : Haut ; B : Bas)

D'autres échelles existent également telles l'échelle MIF (mesure de l'indépendance fonctionnelle) et SF36 (ou questionnaire de santé en 11 points). Plus complètes et plus utilisées dans les services de rééducation fonctionnelle, elles s'attachent souvent à mesurer le degré de dépendance et de qualité de vie de façon beaucoup plus fine que ne le permet le GOS.

### 5.5.2. Mortalité

Le risque de surmortalité des personnes ayant souffert d'un traumatisme crânien a été analysé dans la population écossaise, en particulier dans la tranche d'âge 15-54 ans. Le taux de mortalité attendu dans la population générale est de 2,36/1000 par année, alors qu'il est presque 7 fois plus élevé (17,36) pour ceux ayant eu un TC quelle que soit sa gravité 13 ans auparavant. Dans la tranche d'âge supérieur, même si cette différence est plus marginale, elle reste significative 61,47 vs. 42,36 /1000 par année (McMillan 2011). Ce sur-risque de décès des personnes de moins de 54 ans existe déjà 7 ans après le TC (McMillan 2007). La mortalité des patients au cours de ce suivi de 13 ans est marquée par le fait que 75% des décès surviennent pendant la première année. Cette mortalité de la première année est près de 2 fois supérieure chez les patients ayant eu un TC que chez ceux ayant eu un traumatisme sans TC. Elle est directement corrélée à la gravité du TC. Cette mortalité après TC est près de 10 fois supérieure à celle de la population appariée pour l'âge, le sexe et le niveau social (McMillan 2011). Après la première année, les causes de décès sont similaires à celles de la population de Glasgow (2007). Il existe donc une vulnérabilité de la population des patients ayant eu un TC entraînant une nette perte d'espérance de vie non seulement précocement mais aussi plus tardivement.

### 5.5.3. Epilepsie ou Post traumatic seizure (PTS)

L'épilepsie post-traumatique (PTS) est connue depuis la haute antiquité ! Elle est définie par l'apparition d'une crise d'épilepsie consécutive à un traumatisme crânien. Son incidence est de 2% à 66% selon la gravité des TC, le recul par rapport à l'événement traumatique et les circonstances du TC (Beghi 2003, Bratton 2007, Lowenstein 2009). La présence de micro-hémorragie à l'IRM permettrait de prédire l'apparition de PTS (Kumar 2003). Le vocabulaire anglais permet de séquencer le terme et les manifestations cliniques de l'épilepsie regroupés sous un seul terme en français en 2 sous types de manifestations : « post-traumatic seizure » ou « epilepsia ». (Frey 2003). Cette distinction permet de distinguer une manifestation neurologique exprimée à au moins 2 reprises sans causalité dans un cas, et avec une causalité traumatique dans l'autre.

L'épilepsie post-traumatique (PTS) peut survenir à 3 stades différents : i) immédiatement, ii) précocement (dans les 7 jours), et iii) de façon retardée. Les facteurs de risque de survenue de PTS sont un GCS < 10, une contusion corticale, une embarrure ou un traumatisme crânio-cérébral, un hématome intra-crânien (sous-dural, extra-dural ou intraparenchymateux) et une PTS immédiate. Chacun de ces facteurs de risque véhicule un poids de 15 à 25% d'incidence (Temkin 2003). En réanimation, on évalue à environ 22% le nombre de crises infracliniques mesurées par électroencéphalogramme chez les patients ayant eu une agression cérébrale avec un GCS < 12 (Vespa 1999). Parmi ceux-ci, 50% ont des manifestations infra-cliniques et plus d'un quart développent un état de mal épileptique non convulsivant d'une durée moyenne de 40 minutes. Pour Lowenstein, le fait d'avoir un traumatisme crânien, multiplie le risque de PTS d'un facteur 30, risque qu'il considère majoré encore lors des blessures de guerre (Lowenstein 2009).

En résumé, plus la gravité clinique ou scannographique est marquée, plus le risque d'épilepsie post-traumatique est important. Un traitement prophylactique par la phénytoïne à dose efficace, ne prévient pas la survenue de PTS tardives mais prévient significativement l'apparition des PTS précoces (Temkin 1990). Le Valproate de Sodium est d'efficacité équivalente à la phénytoïne pour la prévention des PTS (Temkin 1999). Au total, les recommandations de traitement sont médiocres basées sur 5 études (Bratton 2007). Les nouveaux anti-épileptiques comme la lamotrigine n'a pas encore fait l'objet de recommandation d'usage comparativement aux autres thérapeutiques même si certain ont montré son intérêt (Showalter 2000).

#### 5.5.4. Déficits sensitivo-moteurs et neuropsychologiques, handicaps

Après TC, la prévalence des déficits sensitivo-moteurs est dépendante de la gravité du TC, de l'existence de lésions intra-cérébrales parenchymateuses ou non, et de la réalisation d'un geste neurochirurgical. Elle varie de 0% pour les TC mineurs à près de 100% pour les TC les plus graves survivant au traumatisme initial.

La rééducation fonctionnelle et le temps passé depuis le traumatisme sont cruciaux pour apprécier le handicap et la qualité de vie ultérieurs. Une consolidation ne peut être envisagée avant plusieurs mois ou années, car comme nous l'avons mentionné au dessus, certains paramètres de l'IRM évoluent au cours du temps, quand on répète ces examens.

Parmi 2523 patients ayant eu un TC mineur et randomisé entre « hospitalisation pour observation » et « scanner », 20-25% n'avaient pas complètement récupéré un niveau de GOSe de 8 (Geijerstam 2010) avec respectivement 0,1% et 0,2% de complications fatales en rapport avec le TC. Le scanner demandé était anormal dans 6% des cas. Sans un suivi après TC mineur, Heskestad et al ont observé une amélioration de la plupart des signes de SPC entre les suivis à 3 mois et 12 mois, de façon significative sur les céphalées et l'irritabilité (Heskestad 2010).

#### 5.5.5. Les troubles cognitifs

A un an après l'accident, près de 50% de ceux ayant eu un traumatisme mineur ou modéré et 76% de ceux ayant un TC grave souffrent de trouble de la mémoire ou de l'humeur (Thornill 2000).

Le fait d'avoir une lésion intracérébrale obère beaucoup plus le pronostic fonctionnel que le fait d'avoir une simple fracture du crâne, même à niveau de GCS ou d'APT comparables (Engberg 2005). Par contre, malgré de faibles niveaux de corrélation, les troubles cognitifs étaient les mieux corrélés avec une atteinte intracérébrale. Enfin, si ces troubles, évalués 5 ans après le TC restaient stables au cours des 15 ans de suivi, la qualité de l'insertion sociale diminuait avec le temps (Engberg 2005).

##### 5.5.5.1. Troubles attentionnels

Plus d'une personne sur 3 ne se souvient pas de l'accident (Hours 2010).

Chez les enfants, il n'a pas été retrouvé de corrélation entre TC et ADHD. Par contre, le fait d'être hospitalisé en service de réanimation est un facteur de risque d'ADHD chez l'enfant (Keenan 2008).

### 5.5.5.2. Syndromes douloureux chroniques

#### 5.5.5.2.1. *Syndrome post-commotionnel*

Le Syndrome post commotionnel apparaît immédiatement, dans les jours ou les mois qui suivent un TC. Les symptômes physiques sont dominés par les céphalées, les troubles de l'équilibre, la fatigue, et la somnolence et des troubles du sommeil. Y sont associés des troubles psychologiques (irritabilité, agressivité, anxiété et dépression). Ce syndrome a tendance à s'amender avec le temps. De plus, le syndrome post-commotionnel s'exprime différemment selon que les patients souffrent de stress post-traumatique ou non (Bryant 1999 JNMD).

#### 5.5.5.2.2. *Douleurs chroniques*

La gravité du traumatisme initial est étroitement corrélée au risque d'avoir des douleurs chroniques ultérieures (Hours 2010). Le TC n'est pas un facteur de risque comparativement à une atteinte d'une autre région corporelle à gravité équivalente (Hours 2010). Ainsi, 63.8% des personnes avec un MAIS <3 et 89.2% de ceux ayant un MAIS  $\geq$ 3 ont des douleurs résiduelles un an après le traumatisme initial quelque soit la région corporelle atteinte (Hours 2010). Les douleurs chroniques en particulier les céphalées chroniques, sont plus fréquentes chez les TC mineurs (75%) que chez les TC modéré ou sévères (32%) chez des civils. Elles sont un peu moins fréquentes, pour les TC mineurs, chez les militaires (40-45%). Un syndrome algodystrophique ou une neuropathie périphérique se retrouve chez environ 10% des TC sévères (Nampiaparampil 2008). Ces symptômes post-comotionnels ou douloureux chroniques sont accessibles à un traitement par les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (Stein 2009). Van der Naalt (1999) rapporte une incidence de 74% de SPC au suivi 1 an après un TC mineur à modéré, GCS 9-14.

### 5.5.6. **Troubles psychiatriques**

Les troubles mentaux après conflits armés sont rapportés depuis au moins 1872 (Jones 2002). Ces syndromes ont pris des dénominations successives, passant d'abord pour des troubles mentaux purs (syndrome de débilité), suivi par un syndrome somatique puis depuis la deuxième guerre mondiale et la guerre du golf, un syndrome neuropsychiatrique. Ces troubles ont souvent manqué d'explications physiopathologiques et se sont expliqués par les avancées des techniques médicales. Ces troubles mentaux sont un handicap pour celui qui les éprouve.

#### 5.5.6.1. Dépression/Suicide :

La dépression n'apparaît habituellement qu'à une phase plus tardive après le TC. Elle touche de 25 à 50% des TC graves. Le suicide est 4 fois plus fréquent chez les TC graves que dans la population générale de la même zone géographique et à niveau socio-économique comparable (Engberg 2004). Le fait d'avoir une lésion endocérébrale aiguë aggrave le risque de troubles de la concentration, de troubles de la mémoire ou de l'humeur. Certains retrouvent une grande correspondance entre anxiété généralisée et dépression majeure (Jorge 2004) et également avec des conduites addictives après TC (Jorge 2005).

#### 5.5.6.2. Anxiété et autres troubles

L'anxiété est constituée de plusieurs entités classée par le DSM IV. On y retrouve le syndrome de stress post-traumatique (PTSD), l'anxiété généralisée (GA), les troubles paniques, et les phobies sociales ou spécifiques et les troubles obsessionnels et compulsifs (TOC).

L'occurrence d'une anxiété survenant au cours de la vie dans la population générale est de 29% alors que des taux de 70% ont pu être rapportés chez des traumatisés crâniens (Moore 2006). En restreignant l'analyse sur les TC mineurs, la prévalence de l'anxiété chute à 23%. Les patients ayant eu un TC mineurs souffrent plus souvent de syndrome dissociatif avec déréalisation, restriction des affects, diminution de l'attention, mais aussi d'autres anomalies de fonctionnement psychique comme des détresses subjectives, et des anomalies du fonctionnement social (Broomhall 2009). Ceci pourrait expliquer une partie de la surmortalité de cette population observée par Teasdale et Enger (2005).

#### 5.5.6.3. PTSD ou Syndrome de Stress post-traumatique :

Le syndrome de Stress post-traumatique est caractérisé par la mémorisation intrusives d'événements traumatisant se manifestant par des symptômes physiques et psychiques invalidants. Quand ces manifestations durent moins de 1 mois, on parle de syndrome aigue de stress, quand elles durent plus de 1 mois, le diagnostic de PTSD est retenu. Le PTSD est diagnostiqué chez 39% des personnes ayant eu un accident de la circulation, 15% des vétérans du Vietnam, et 24% des adultes jeunes des villes (Koren 1999). Le PTSD augmente le risque de suicide mais sans que le TC soit en cause pour certain (Brenner 2010). Si PTSD et TC sont ajoutés l'un à l'autre, ils augmentent fortement le risque de syndrome post-commotionnel (Brenner 2010). L'identification du PTSD peut être réalisée dès le 7<sup>e</sup> jour. Les troubles du sommeil sont également des facteurs prédictifs de PTSD (Koren 2005).

Pour certains, la perte de connaissance et l'amnésie post-traumatique seraient des facteurs protecteurs de PTSD puisqu'il n'y aurait pas de mémorisation possible d'un événement vécu sans conscience. Mais d'autres réfutent ces hypothèses et déductions selon la théorie des îlots mémoriels (Moore 2006).

#### 5.5.7. Perception de la santé, perte de travail ou de lien social

Parmi une cohorte de près de 1000 individus ayant subi un TC mineur au cours d'un accident de la route, alors que 75% d'entre eux se sentaient en bonne santé avant l'accident, 70% éprouvaient des difficultés en rapport avec leur santé après l'accident (Zhang 2009). Une mauvaise qualité de la santé était rapportée par plus de 30% des patients avec TC mineur après un accident de la route alors qu'elle ne concernait que 0,8% de ceux ci avant l'accident (Zhang 2009). Des arrêts de travail ont été donnés à 80% des personnes atteintes de lésions AIS inférieures à 3 et à presque 100% de ceux ayant eu au moins une lésion AIS 3 (durée moyenne  $168 \pm 68$  jours) quelque soit la zone corporelle atteinte. Les étudiants ont interrompu leurs études après une lésion AIS  $< 3$  dans 40% des cas et dans 72% des cas quand la lésion était d'une gravité AIS  $\geq 3$  (Hours 2010).

Le GCS, la durée de l'amnésie post-traumatique, le nombre de jours d'hospitalisation, les troubles cognitifs et l'indépendance fonctionnelle au moment de la sortie de l'hôpital tout comme le GOS sont significativement corrélés au retour à l'emploi, la qualité de l'environnement familial, la qualité de l'environnement extra-familial et des activités de loisirs (Engberg 2004, 2005).

### 5.6. Traitements et prévention

Javouhey et col ont décrit l'incidence de la traumatologie crânienne après un accident de la voie publique à l'aide du registre des accidents du Rhône pour les années 1996-2003. L'étude consistant à suivre l'évolution de la traumatologie crânienne entre 2 périodes de temps a été abordée en partie par Gadegbeku et col (2010). Cette étude montre que l'incidence de la traumatologie crânienne diminuait de 45% pour les lésions létales et de 15% pour les TC avec séquelles lourdes. Les autres lésions et le descriptif lésionnel des TC n'ont pas été abordés dans ce papier et restent à étudier. Il existe donc une amélioration de la mortalité et de la morbidité lourde pour les TC mais qui ne se retrouve pas pour les TMD.

Le traitement passe par la prévention selon trois étapes : prévention primaire, secondaire, et tertiaire.

### **5.6.1. Prévention primaire : diminuer l'incidence du TC**

La prévention primaire consiste à éviter que le traumatisme crânien ne survienne c'est à dire à en diminuer la prévalence. Gadegbeku et col (2010) soulignent que cette réduction de la mortalité après TC s'observe dans tous les pays européens, et est en rapport, partout, avec la réduction des vitesses moyennes sur l'ensemble du réseau routier principalement pour les occupants de voitures mais aussi pour les motocyclistes (ONISR 2009). Cette baisse de la mortalité est inférée également à l'amélioration du taux d'usage de la ceinture de sécurité qui avoisine, en France, 99% pour les passagers avant et 90% pour les passagers arrières des voitures pour ces dernières années. La très importante réduction de la traumatologie dans la population pédiatrique est en rapport avec une très forte pénétration des dispositifs de protection et d'adaptation des véhicules au transport des enfants (Gadegbeku 2010). Enfin le développement de la sécurité primaire passive des véhicules a montré de nets progrès à l'impact avec une augmentation des équipements de sécurité en série dans les véhicules (airbag, déformabilité des habitacles, prétenseur de ceintures de sécurité, Système ABS...). Pour finir, on ne peut négliger l'amélioration de l'architecture routière (réduction des traverses d'agglomération, système de protection des passages piétons enfants, disparition des routes à 3 voies non affectées, enrobés drainants, ronds-points,...), même si ces améliorations sont plus difficilement mesurables.

### **5.6.2. La prévention secondaire : Réduire la gravité immédiate du TC lorsqu'il y a TC**

La prévention secondaire consiste à réduire la gravité de la pathologie quand celle ci survient. Elle est mise en jeu au niveau du système de santé par l'utilisation des équipes mobiles préhospitalières, par des systèmes de régulations et orientations des patients vers des structures hospitalières adaptées à leur niveaux de gravité, par la formation des médecins et l'optimisation de la prise en charge des patients avec TC. Autant, les structures sont présentes et ont une définition administrative claire, autant la qualité de la formation des intervenants paraît beaucoup plus aléatoire. En effet, le nombre de cas de TC graves inclus dans le registre des accidents du Rhône est, pour la période 2003-2008 de 642. Ceci correspond à une incidence annuelle de 107 nouveaux cas par an. L'effectif des médecins participants à la prise en charge préhospitalière dans le Rhône est d'environ 100 médecins seniors sur le SAMU de Lyon, ce qui signifie que chaque médecin ne prend en charge dans la région lyonnaise que 1 à 2 TC graves en moyenne par an. En effet, les TC graves sont composés à un peu plus de 50% par les accidents de la route, suivi d'une très large part de chute (40-45%), et beaucoup plus

rarement (<10%) de traumatismes balistiques ou liés à des corps étrangers contondants ou à des accidents de sport. Ainsi, l'harmonisation des pratiques en situation exceptionnelles et stressantes, avec parfois des personnels temporaires, est difficile et induit une grande variabilité dans la qualité de la prise en charge et peut être opérateur-dépendant. Ainsi, l'évaluation de la gravité neurologique, de la sécurisation des voies aérodigestives supérieures par le recours à une intubation et une ventilation assistée, faisant partie d'une prise en charge classique du TC grave ne semblent pas poser de difficultés particulières. Il en va tout autrement de la prise en charge des troubles hémodynamiques observés après TC grave. En effet, l'hypotension artérielle est fréquemment observée et est un déterminant majeur dans l'apparition de complications secondaires nommées ACSOS (agression Cérébrales Systémiques d'Origine Secondaire).

Facteur d'agression cérébrale secondaire d'origine systémique (ACSOS)	Variables mesurées
<b><i>Historiques</i></b>	
Anémie (g/L)	80-100 < Hémoglobine < 150
Hypoxie (mmHg)	60 < PaO <sub>2</sub> < ?
Hyper/hypocapnie (mmHg)	35 < PaCO <sub>2</sub> < 40
Hypo/Hyperglycémie (g/L)	6-7 < glycémie < 10
Hyperthermie (°C)	37,5 < T°
Acidose - Alcalose	7,37 < pH < 7,45
Pression artérielle moyenne (mmHg)	60 < PAM < 90
<b><i>Probables</i></b>	
Troubles de la coagulation	TCA > 1,5xT ; TQ < 60% ; INR > 1,4
Plaquettes (G/L)	100 < Plaquettes < ?
Epilepsie	Durée, répétition

Tableau 8 : ACSOS : ou agression cérébrale secondaire d'origine systémique

Des techniques de craniectomie décompressives chirurgicales ont été développées pour pallier les effets de la gravité de certains traumatismes crâniens. Hélas, pour l'heure, ces techniques, bien qu'elles permettent de contrôler le niveau de la pression intracrânienne et la pression de perfusion cérébrale, et réduisent la mortalité immédiate, n'améliorent pas le pronostic fonctionnel voir aggravent le nombre de patients survivants avec des séquelles lourdes (Cooper 2011).

Un certain nombre de complications métaboliques ou électrophysiologiques ont été mis en évidence lors d'hypotensions induites en conditions expérimentales chez les rongeurs. Ainsi Geeraerts et col ont montré qu'apparaissait une augmentation du ratio Lactate/Pyruvate chez les animaux soumis à une hypotension après un TC expérimental (Gerraerts 2006, 2008). D'autres auteurs ont montré que l'hypotension de façon prépondérante par rapport à l'hypoxie, favorisait le développement d'ondes de dépolarisation lentes (ODL) (Sukhotinsky 2008, 2010). Ces ODL sont considérées, par certains, comme des marqueurs de mauvais pronostic dans le cadre des agressions cérébrales chez l'homme (Dreier 2011) et en particulier dans le contexte du traumatisme crânien (Hartings 2010, 2011). La répétition du passage de ces ondes de dépolarisation de façon circulaire (Bosche 2010) a été identifiée comme un facteur de déstabilisation métabolique dans un tissu en souffrance et peut conduire à une progression et une extension des lésions cellulaires et tissulaires (Dreier 2011). Ainsi, à l'éclairage de ce paragraphe, l'hypotension initiale lors de la prise en charge du TC grave à la phase préhospitalière, peut avoir des conséquences non négligeables sur la prévention secondaire du TC.

Un autre volet de la prévention secondaire est le développement de moyens pharmacologiques de protection tissulaire et cellulaire afin de préserver les capacités des tissus à survivre à une agression générale et locale. Les différentes molécules disponibles ont été revues par Wheaton et col (2011) dans une méta-analyse des effets pharmacologiques psychiatriques et neuro-psychiatriques. A partir de critères très stricts, ces auteurs montrent que parmi les molécules jouant sur les récepteurs dopaminergiques, sérotoninergiques ou cholinergiques, les bloqueurs des canaux sodiques, les peptides et les phospholipides, seuls les traitements modulateurs des récepteurs dopaminergiques (méthylphénidate, Ranitidine ®) permet d'améliorer les troubles psychiatriques dépressifs, le syndrome post-commotionnel et le devenir psycho-social quand l'étude est réalisée en double aveugle (Wheaton 2011). Le Donepezil améliore les scores neurocognitifs de mémoire et d'attention. L'amantadine accélère l'éveil, et le devenir global. Ces résultats ont été obtenus sans majoration de troubles neurocomportementaux contrairement à d'autres molécules (Agonistes sérotoninergiques) qui ont tendance à majorer le syndrome post-commotionnel (céphalées, irritabilité, troubles du sommeil). Enfin, ce résultat se maintient, que l'initiation du traitement soit fait à la phase post-traumatique immédiate (avant la 4<sup>e</sup> semaine) ou retardée (après la 4<sup>e</sup> semaines) (Wheaton 2011). Néanmoins, les collectifs étudiés pour cette méta-analyse sont petits et les auteurs rappellent que des études avec une puissance statistique suffisante doivent être entrepris.

### **5.6.3. Prévention tertiaire : Améliorer la prise en charge du TC par des actions de formation**

La prévention tertiaire intervient quand la maladie est installée pour réduire la récurrence ou les complications de celle-ci. Comme nous l'avons vu précédemment, la formation initiale et continue des médecins ayant à prendre en charge les patients atteints de TC à la phase pré-hospitalière doit être encore améliorée. En effet, un audit non encore publié réalisé par l'équipe du CHU de Bicêtre (coordonateurs B. Vigué, K. Tazarourte) a montré que le non respect des recommandations pour ce qui est du maintien des paramètres hémodynamiques à des niveaux souhaitables (PAS > 90 mmHg) était obtenu dans moins de 50% (Tazarourte K, Filières de soins : le TC grave, congrès de l'ANARLF 2010, Bordeaux, [www.anarlf.eu](http://www.anarlf.eu)). Ces éléments n'ont pas de spécificité quant à la prise en charge préhospitalière car ils se retrouvent dans presque la moitié des cas quand on analyse les dossiers intrahospitaliers des patients souffrants de traumatisme médullaire déficitaire (40% de patients ayant une pression artérielle inférieure à 90 mmHg pendant 50% du temps de prise en charge (communication O Fourcade, Congrès de l'ANARLF 2007, Lyon).

La question est donc : faut-il cibler des molécules nouvelles ou faut-il déjà améliorer les pratiques pour les rendre les plus cohérentes possibles avec les standards des recommandations de prise en charge de ces patients avec un traumatisme du système nerveux central ?

Nous faisons l'hypothèse que les 2 voies doivent être suivies et dans la dernière partie de ce travail nous nous focaliserons, à partir des événements identifiés chez l'homme à la phase aiguë ou chronique sur l'intérêt des recherches sur le petit animal afin de tenter de dépister des signes cliniques et radiologiques similaires à ceux observés chez l'homme. Ceci permet ainsi de modéliser les conséquences du TC et d'envisager l'exportation vers l'homme des perspectives favorables des études précliniques et en particulier des effets de l'Epo-rh.

## **6. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES : TRAUMATISMES CRANIENS EXPERIMENTAUX**

---

Pour tester les différentes potentialités thérapeutiques, il est souvent nécessaire avant de passer aux essais cliniques de phase 1, de procéder par des études sur les animaux en particulier les rats pour des raisons de coûts, de reproductibilité et de diversité des approches. Pour cela, il nous faut apprécier les mécanismes et les conséquences histologiques des 4 modèles expérimentaux de TC à la disposition des chercheurs, en apprécier les effets comportementaux et en chercher les effets sur des paramètres intermédiaires (IRM, PET, Microdiayse) qui peuvent être exportés ou qui sont déjà analysés chez l'homme. Enfin, on peut utiliser ces modèles pour tester des molécules ou des variations des milieux environnants (Température, enrichissement du milieu de vie, ...) ayant des effets favorables sur les conséquences du TC et sujettes à être exportées chez l'homme. Nous verrons donc dans un premier temps les différents modèles de TC expérimentaux et la mortalité rapportée à chacun de ces modèles. Puis, en se focalisant sur le TC par LFPI, nous exposerons les conséquences histopathologiques retrouvées, les anomalies des différents tests neurocomportementaux qui ont été évalués, et celles observées avec l'IRM.

### ***6.1. Les différents modèles expérimentaux de traumatisme crânien***

Les modèles de traumatisme crânien peuvent se résumer deux grands types expérimentaux de TC : i) des traumatismes crâniens à boîte crânienne fermée ou ii) des TC expérimentaux à boîte crânienne ouverte.

#### ***6.1.1. Traumatisme crânien à boîte crânienne fermée (CHI : Controlled head injury ou Impact Acceleration Model)***

Pour les modèles à boîte crânienne fermée, la seule réalisée et normée est celle mise au point par Marmarou en 1994. Son intérêt consiste, théoriquement, dans la genèse de lésions axonales diffuses d'accélération/décélération. Ce traumatisme est réalisé par la chute d'un poids, d'une hauteur variable. Plus la hauteur ou plus le poids seront importants, plus les lésions et donc corolaire, plus la mortalité seront importantes (Marmarou 1994, Fado1994). Pour générer des lésions axonales diffuses, il est nécessaire que le traumatisme initial soit important, c'est à dire que le poids (450-500g) ou la hauteur de chute du poids (1,5 à 2 m) soit élevé. Dans ces conditions, le traumatisme crânien génère une mortalité de 40 à 70%, réduite à 10-25% par le recours à la ventilation artificielle (Marmarou 1994a).

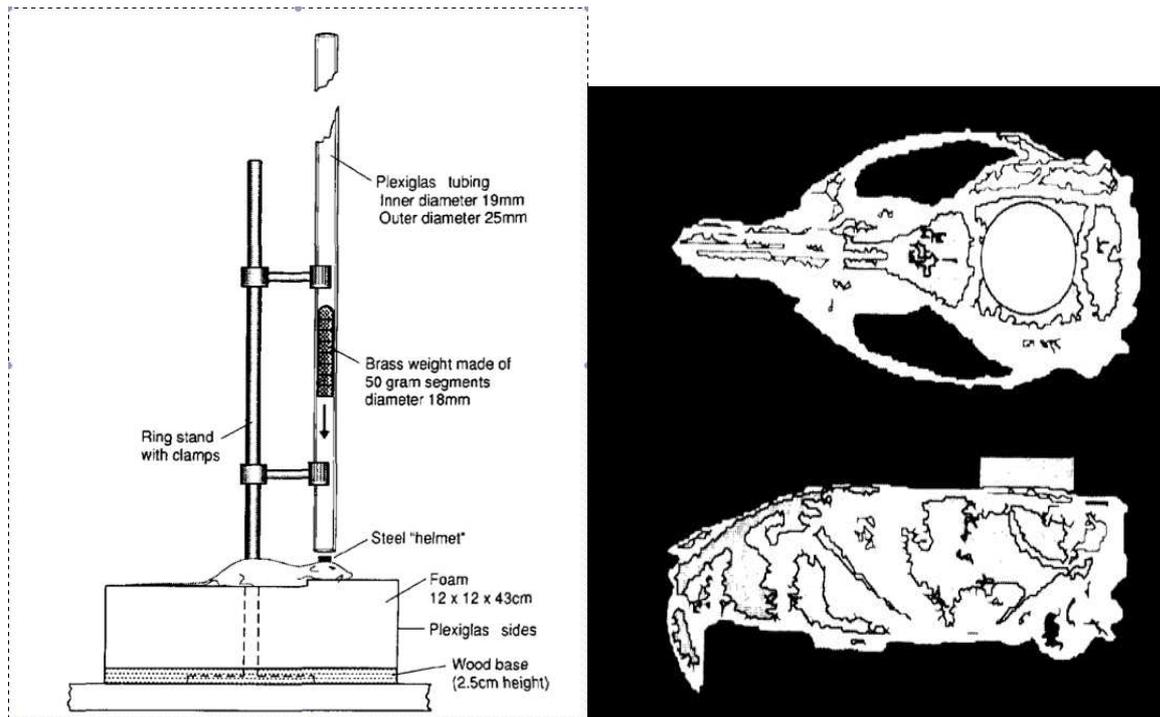


Figure 7 : Modèle de Closed Head Injury (CHI) ou accélération-décélération, ou de lésions axonales diffuses (Marmarou 1994, Fado 1994)

Ce modèle est utilisé par les équipes de Bicêtre (T Geeraerts) et de Grenoble (JF Payen). Pour réduire la mortalité des études, la majorité des équipes publiant sur ce modèle. Certains utilisent une version latéralisée du CHI avec un impact non pas médian mais pariétal (Yatsiv 2005).

Dans les observations initiales, les lésions retrouvées sont des lésions oedémateuses avec rupture de la barrière hématoencéphalique (BHE) et des lésions neuronales. La caractérisation des ruptures axonales reste débattue (données personnelles) et mériterait d'être réévaluée à la lumière des nouvelles techniques de marquage et d'IRM. Les dernières publications (van de Looij 2011) tendent à montrer l'absence de rupture de la BHE à l'aide d'IRM de perfusion. Les techniques de marquages et les tenseurs de diffusion donnent cependant des résultats contradictoires. En effet, même si les auteurs retrouvent des différences sur les paramètres des tenseurs de diffusions induites par le traumatisme, ces modifications vont dans le sens d'une ballonnisation des axones avec une réduction des espaces intercellulaires (diminution de l'ADC, et diminution de la FA). Cette expérimentation est limitée aux toutes premières heures suivant le traumatisme alors que dans d'autres papiers, les mêmes auteurs avaient réalisé un suivi longitudinal de 6h (Verdonck 2007), et que d'autres auteurs ont procédé au suivi des animaux sur un à plusieurs mois (McDonald 2007) (Immonen 2009, Kharshvili 2009).

### 6.1.2. Traumatisme crânien à boîte crânienne ouverte

Il existe trois types de modèles de TC à boîte crânienne ouverte actuellement utilisée: le Lateral Fluid Percussion Injury (LFPI), le CCI (Controlled Cortical Impact) et le Weight-Drop Injury (WDI).

#### 6.1.2.1. Le traumatisme crânien par percussion fluide latérale (LFPI)

Le LFPI est le modèle que nous avons utilisé dans ce travail sur le TC expérimental et l'Epo-

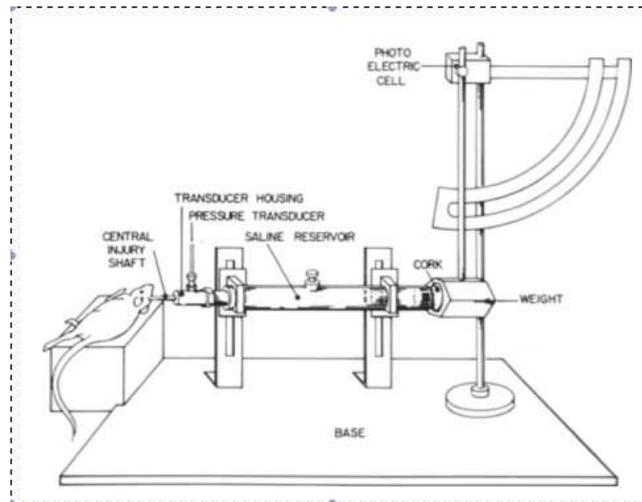


Figure 8 : modèle de traumatisme par compression fluide latérale (LFPI) (McIntosh 1989)

rh. Il est commercialisé par l'université de Virginie aux USA (Dixon 1987, McIntosh 1989). Il est utilisé en Ecosse (Rhodes 2009). En France, à Paris, une équipe a mis au point une version modifiée de ce modèle en utilisant non pas un balancier mais un système à haute pression contrôlé par une valve (Besson 2003, Louin 2008, Lescot 2010).

Pour réaliser ce traumatisme, il faut d'abord réaliser une craniectomie d'environ 5 mm (de 3 à 6 mm) de diamètre sans traumatiser la dure mère. Puis, à une extrémité, on connecte de façon étanche l'espace intra-crânien et extradural avec une colonne fluide contenue dans un cylindre indéformable. Cette colonne fluide est percutée, à l'autre extrémité où se situe un piston, par un marteau pendulaire dont la hauteur de l'excursion détermine la sévérité du traumatisme. On enregistre la violence du choc à l'aide d'un transducteur de pression connecté au système clôt, ce transducteur étant relié à un oscilloscope.



Figure 9 : courbe oscilloscopique de l'enregistrement d'un traumatisme par LFPI. Axe horizontal : 1 carreau = 10 ms, axe vertical : 1 carreau = 250 mV

L'augmentation de pression induite par le choc du marteau sur le piston génère une onde de pression d'une durée d'environ 20 msec et l'intensité du choc varie en fonction de l'angulation (ou hauteur) à partir de laquelle le marteau est lâché (voir figure 8). Il est montré que l'intensité du traumatisme induit une différence de mortalité ainsi qu'une variation de la mémorisation spatiale pour les intensités élevées (McIntosh 1989, Sanders 1999). Sur le plan électroencéphalographique, il existe une bonne corrélation entre l'intensité du choc et la dépression de l'EEG post-traumatique (McIntosh 1989, Dixon 1987). La variation d'intensité induit également des changements dans le LPT enregistré 8 semaines après le traumatisme (Sanders 2000) mais également favorise l'émergence de cortical spreading depolarization ou ondes lentes de dépolarisation (Rogatsky 2005). La limite principale de ce modèle est la réalisation involontaire d'une plaie de la dure-mère qui passe inaperçue au moment de la réalisation de la craniectomie. En effet, lors de la percussion de la colonne fluide, l'issue d'eau à l'intérieur du crâne ne sera pas limitée à l'espace extradural mais en cas de plaie de la dure mère, l'eau pourra faire issue dans le parenchyme cérébral ou dans l'espace sous-dural (voir image).

Il existe un modèle LFPI dérivé du précédent mais au lieu d'un système pendulaire, heurtant la colonne d'eau en contact avec l'espace extradural, il s'agit d'une valve solénoïde qui contrôle la durée et le niveau de pression générée sur une colonne d'eau également en contact avec l'espace sous dural selon le même montage. Pour induire un niveau de pression de 1,6-1,8 atm, les auteurs signalent qu'ils règlent la valve à un niveau de 5 atm. Quand ils rapportent la mortalité induite par leur modèle, pour un niveau de traumatisme de 1,6-1,8 atm, celle-ci s'élève à 34% (Lescot 2010), ce qui correspond à des niveaux de traumatisme de l'ordre de 3,5 à 4 atm dans le modèle LFPI standard que nous avons employé. Nous signalerons donc quand ce modèle est employé sous le label « LFPI modifié » (LFPI<sub>m</sub>) (Toulmond 1993, Besson 2003, Louin 2008, Lescot 2010).

#### 6.1.2.2. L'impact cortical contrôlé (CCI)

Le traumatisme crânien par impact cortical contrôlé (CCI Controlled Cortical Impact)(Lighthall 1988) est utilisé aussi souvent que le LFPI. A l'aide d'un piston électropneumatique, et après avoir réalisé une craniectomie de 3-6 mm, cette machine de trauma est réglée pour libérer le piston, mis en contact avec le cortex en regard de la dure mère, à une vitesse et pour une excursion donnée, en direction du cortex. Les paramètres importants sont i) le diamètre du piston, ii) la vitesse de déplacement du piston, iii) la profondeur à laquelle le piston plonge dans le cerveau et iv) la durée de l'excursion du piston. Pour les CCI importants, il existe toujours une plaie crânio-cérébrale et les lésions observées en histologie ou en IRM de diffusion ou T2 sont très différentes de celles observées après un LFPI (Obenaus 2007, McDonald 2007, Brody 2006).

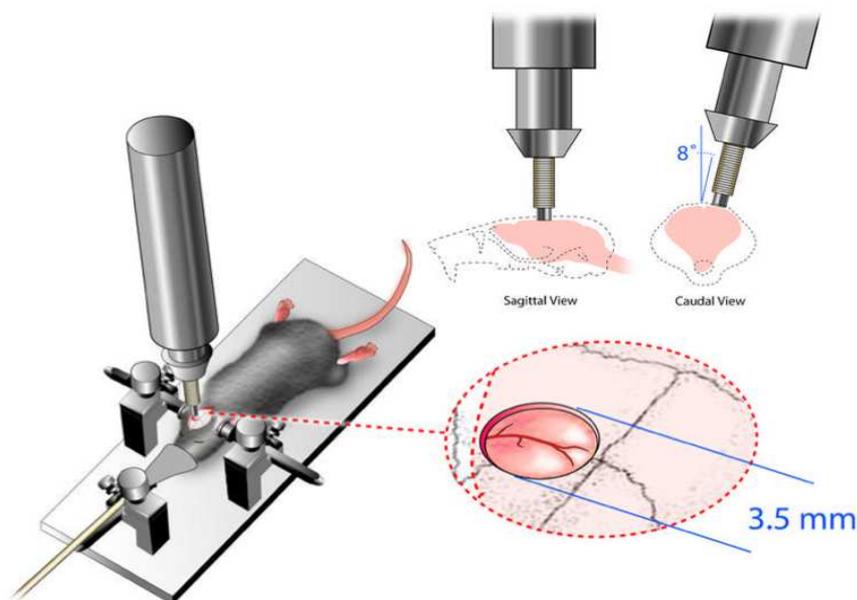


Figure 10 : modèle de traumatisme par impact cortical contrôlé (CCI) (D'après Dixon 1988)

La majorité des études s'étant intéressées aux troubles neurocomportementaux après TC ont utilisé le modèle de CCI car les lésions sont probablement plus importantes que celles induites par le LFPI avec un meilleur taux de survie. Néanmoins, pour les hauts niveaux de profondeur et de vitesse d'excursion du piston, patho-physiologiquement, ce modèle s'approche plus d'un modèle de plaie crânio-cérébrale expérimentale avec lésions parenchymateuses et rupture de la dure mère immédiate. Ce modèle n'a pas fait l'objet de publication en France à notre connaissance.

#### 6.1.2.3. Chute traumatique d'un poids (Weight Drop Injury)

Le WDI se rapproche du CCI mais c'est une bille d'un poids de 25 à 80 g qui va percuter d'une hauteur variable (15 à 50 cm) un piston mis en contact avec la dure mère. Le

poids requis pour induire le traumatisme est un poids beaucoup plus faible que dans le CHI car la dure-mère est directement exposée au traumatisme par une craniotomie. A l'opposé du CHI, il induit un choc cortical focal comme le CCI mais par une mobilisation rapide de l'encéphale à l'intérieur de la boîte crânienne.

#### 6.1.2.4. Comparaison des modèles

Très peu d'études ont comparé directement les lésions induites par chacun de ces modèles sur plusieurs paramètres (histologiques, comportementaux, IRM), et à des niveaux d'intensité de choc variables. Quelques éléments d'orientation peuvent être retrouvés dans la littérature pour montrer la différence entre ces différents modèles.

Alors que le LFPI induit une augmentation transitoire mais soutenue de la pression intracrânienne, le CCI n'induit quasiment aucune variation de la pression intracrânienne immédiatement après le trauma (Clausen 2005). De façon concomitante, une augmentation de la pression artérielle est observée, plus marquée pour le LFPI que pour le CHI ou le CCI. Par contre, plus tardivement dans les heures suivant le TC, l'augmentation de la pression intracrânienne n'est associée ni à un type de traumatisme, ni à une association avec une hypoxie mais plutôt à l'apparition d'un hématome intra-parenchymateux (Gabiellan 2011). Obenaus et al ont montré que les lésions en IRM pouvaient être mesurées après LFPI ou CCI mais sans préciser le paramétrage du traumatisme pour le CCI (Obenaus 2007).

### **6.2. *Evaluation de la gravité du TC expérimental***

Deux grands axes de mesures sont utilisés pour évaluer les effets du traumatisme crânien expérimental et des diverses attitudes thérapeutiques testées : soit les auteurs se fixent sur un marqueur intermédiaire reconnu et identifié comme pathologique et pathogène (inflammation, apoptose, œdème cérébral, ...) soit les auteurs évaluent un effet clinique chez l'animal (comportement sensori-moteur, apprentissages et mémorisation, stress/anxiété, dépression, survie). Nous aborderons les différentes conséquences cellulaires, humorales, au niveau de la régulation génique inflammatoire et du système Epoergique, les conséquences vasculaires comportementales rapportées après un TC-LFPI et nous verrons quels sont les effets favorables observés avec l'Epo-rh justifiant du développement des études sur le sujet. Nos travaux publiés ou en cours de publication concluront ce chapitre.

### 6.3. *Mesures des effets du TC expérimental*

Le traumatisme crânien expérimental requiert une chirurgie qui a des effets sur les variables lésionnelles mesurées en IRM ou en biologie moléculaire. Les conditions expérimentales dans lesquelles sont réalisées les mesures de la récupération et la neuroprotection doivent préciser les contrôles employés, s'ils sont naïfs de toute chirurgie ou non traumatisés.

#### 6.3.1. **Mortalité immédiate**

La première conséquence facilement mesurable de la gravité d'un TC est la mortalité. Sont également associés l'arrêt cardio-respiratoire de plus de 1 min et le délai d'éveil (récupération du « righting reflex »). Globalement, la mortalité immédiate est directement proportionnelle à l'intensité du traumatisme, correspondant selon les modèles à la genèse d'une hyperpression transitoire intracrânienne (LFPI), à une plaie pénétrante à l'intérieur même de l'encéphale (CCI) et à des phénomènes d'accélération/décélération induit par le CHI.

##### 6.3.1.1.1. *Mortalité après LFPI*

Dixon et al (1987) observaient une mortalité < 10% avec un FPI médian de 1 atm, s'élevait à 25% pour 2 atm, et à 60% pour 3,6 atm (Dixon 1987). L'utilisation d'une ventilation artificielle réduisait la mortalité de 60% à 50%. McIntosh et al ont montré qu'en latéralisant le FPI, la mortalité observée pour un choc à 3,6 atm était similaire et que la mortalité dans les 7 premiers jours restait à 60% malgré le recours à une ventilation artificielle (Mc Intosh 1989). En cas de traumatisme plus sévère, il existe une grande diversité de lésions visibles en histologie, en imagerie et les conséquences comportementales en sont proportionnellement plus aisément mesurables.

Durant l'ensemble du programme de recherche que nous avons mené, la mortalité dans notre étude, pour un LFPI de 1,6-1,8 atm que ce soit à Lyon ou à Edinburg a été autour de 1%, avec un seul cas d'arrêt respiratoire fatal en dehors des phases d'apprentissage de la méthode. Pour 3 atm, la mortalité a augmenté à 20%, pour 4 atm, elle est montée à 45%.

##### 6.3.1.1.2. *Mortalité après CHI*

Pour le modèle de CHI, des chocs induits par un poids de 450-500g chutant d'une hauteur de 1,5-2 m induisent une mortalité de 40-50% par apnée terminale (Verdonck 2007, Marmarou 1994). Le recours à une ventilation artificielle permet de diminuer la mortalité de plus de la moitié (Verdonck 2007).

#### 6.3.1.1.3. *Mortalité après CCI*

Rares sont les études rapportant la mortalité après CCI. Pourtant i) les profondeurs d'incursion du piston, ii) la vitesse de déplacement de celui-ci, iii) la surface du piston impactant la dure mère et iv) la durée de l'impact sont, à notre avis, quatre composantes essentielles de la sévérité des lésions induites par ce modèle. Pour une vitesse d'excursion de 4 m/sec avec un temps d'impact de 150 ms, une excursion de 1,5 ou 2,0 mm produit 10% de mortalité alors qu'une excursion de 2,7 mm chez le rat induit une mortalité de 44% (Igarashi 2007). Aucune apnée n'était notée dans le groupe à 1,5 mm, 23% dans le groupe à 2 mm et 77% dans le groupe où la course du piston était de 2,7 mm. Nous n'avons retrouvé aucune donnée sur la mortalité du CCI chez la souris.

#### 6.3.1.1.4. *Mortalité après WDI*

Nous n'avons pas retrouvé de données sur la mortalité induite par le WDI.

### 6.3.2. **Effets comportementaux**

#### 6.3.2.1. Effets sensori-moteurs

##### 6.3.2.1.1. *Scores neurologiques composites*

De nombreuses équipes ont créé des scores neurologiques composites évaluant de façon plus ou moins objectives un déficit sensori-moteur.

Objectif: réaliser un examen neurologique chez l'animal à partir de test neurocomportementaux évalués par un expérimentateur.

Méthodes: des tests de grip, de déplacement, de résistance à une contrainte latérale, etc... sont en général détaillé dans les travaux et permettent d'estimer un déficit neurologique uni ou bilatéral.

Mesures: le score pour chaque variable de l'examen clinique est de 0 ou 1. La moyenne de la somme totale des scores de chaque variables est comparée entre les groupes.

Résultats attendus: McIntosh et col (1989) ont mis en évidence des anomalies comportementales après LFPI de 2 atm en employant des tests de tenues de pattes, de résistance latérales, etc.... Pillay 2005 a montré la perte de fonction sensori-motrice par un score composite avec des résultats cohérents avec ceux précédemment obtenus par McIntosh (1989). Cette même équipe a montré que les tests neurosensitifs restaient perturbés jusqu'à 2 mois après un LFPI de 2,7-3,0 atm (Pierce 1998). Dans le LFPI modifié, Besson (2003), puis

Louin (2008) et enfin Lescot (2010) rapportent tous, des troubles sensori-moteurs évalués par un score composite, tous d'une durée supérieure à 3 semaines tout comme dans la publication originale de McIntosh (1989). S'il est validé pour le CCI, le score composite reste un score opérateur dépendant (Xiong 2010). Néanmoins, même si les scores de cohérence interobservateurs sont bons (93% pour McIntosh 1989), il reste que cette appréciation est une analyse clinique subjective, non corroborée par des déficits moteurs qui ne s'expriment pas dans les distances ou les vitesses moyennes de nages appréciées maintenant dans les tests de la piscine de Morris analysés par vidéotracking.

#### 6.3.2.1.1. *Retrait d'adhésif, (Adhesive Removal Test)*

Objectif: le test de retrait d'adhésif a comme objectif d'évaluer une anomalie de la latéralisation de la coordination motrice ou de la sensibilité. Une asymétrie de perception ou de motricité devrait s'accompagner d'un allongement du temps de retrait de l'adhésif.

Méthode : une pastille adhésive est collée sur i) la face palmaire ou ii) la face dorsale ou enfin iii) autour de la patte des rats.

Mesures : les latences avec lesquelles les rats retirent l'adhésif (en secondes) et la première patte que les rats choisissent de libérer de l'adhésif (gauche ou droite) sont évaluées.



*Figure 10 : différents types de positionnement des papiers collants pour le test de retrait d'adhésif*

Résultats attendus : Pour les rats ayant une agression cérébrale asymétrique, on attend un allongement des délais d'identification et de retrait d'un adhésif accroché aux pattes antérieures des rongeurs. Faisant l'hypothèse d'une latéralisation non dominante du rat, on peut attendre une augmentation du délai tant de l'identification que du retrait de l'adhésif du côté opposé au traumatisme (droite en l'occurrence). L'augmentation du délai de retrait traduirait une altération des capacités sensitivo-motrices (Kotomar 2007, Bouet 2009, Sughrue 2006). Cette méthode permet d'apprécier un déficit sensitivo-moteur dans des modèles d'AVC focaux (Sughrue 2006). Nous avons fait l'hypothèse que le LFPI réalisé en

regard du cortex somatotopique pouvait être à l'origine de manifestations sensitivo-motrices révélées par le test de retrait d'adhésif.

#### 6.3.2.1.2. Foot Fault test ou test d'erreur de pattes

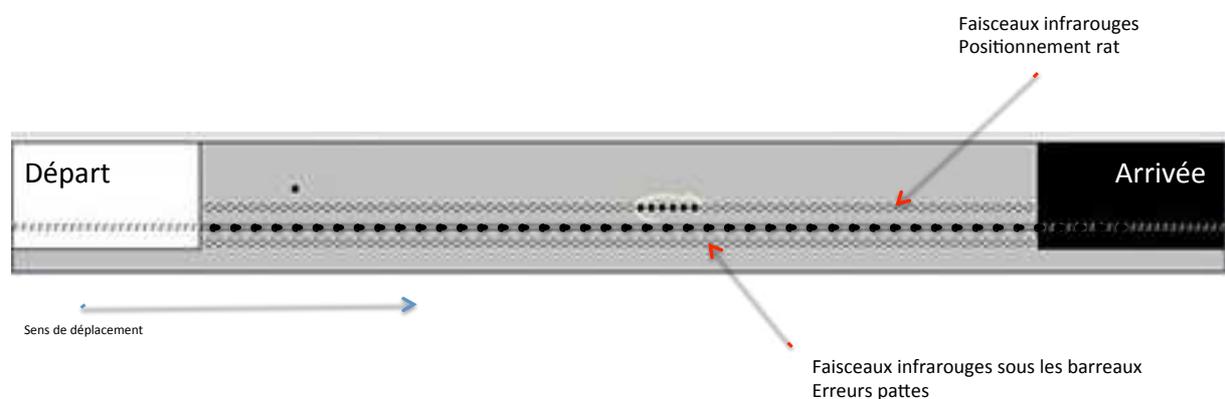
Objectif: Le test de Foot fault test (FFT) ou test d'erreur de placement des pattes cherche à mettre en évidence un trouble de la coordination motrice chez le rat.

Méthode: Ce test est effectué à l'aide d'une machine d'analyse automatique du compte des interruptions des faisceaux infrarouges positionnés juste sous les barreaux d'un couloir que les rats traversent (Bioseb)(figure 11). Lorsque la patte glisse ou se positionne anormalement sur le barreau, elle coupe l'un des faisceaux infrarouges. Une autre série de faisceaux infrarouges situés au dessus des barreaux permet de déterminer le trouble de la coordination antérieure ou postérieure, mais ne peut déterminer la latéralisation de l'erreur (Bioseb Instruments).

Mesures: le nombre d'erreurs de patte avant et arrière est enregistré automatiquement lors de 3 passages successifs réalisés à J5, J10, J30 après LFPI.



A



B

Figure 11 : A : Matériel employé pour réaliser le test d'erreur de pattes. B : présentation schématique du système.

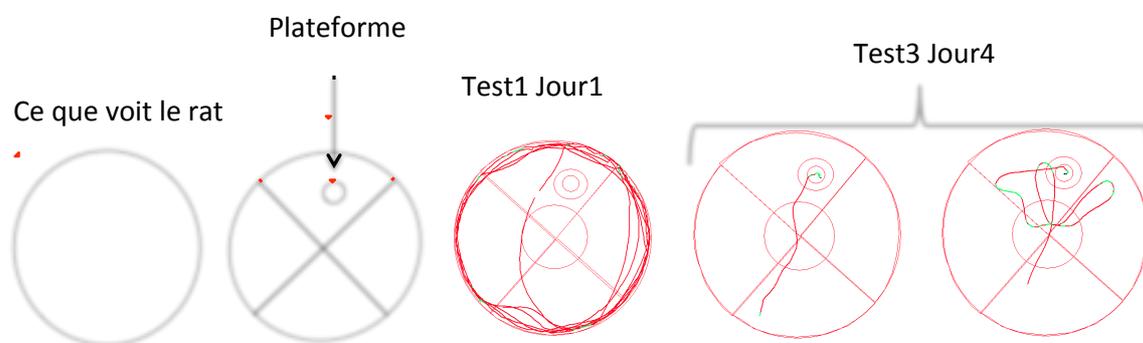
### 6.3.2.1.3. *Autres tests sensori-moteurs*

Il existe de nombreux autres tests sensori-moteurs (Beam-walk test, rota-rod test, ...) que nous ne détaillerons pas ici car nous ne les avons pas employés dans nos protocoles d'étude.

### 6.3.2.2. Effets sur la mémorisation : Test de la piscine de Morris. Apprentissage et Mémorisation

## Test de la Piscine de Morris

### *Test d'apprentissage*



*Analyses par essai ou moyenne des 3 essais sur chacun des 4 jours d'apprentissage*

- % rats ayant trouvé la plateforme
- Latence pour trouver la plateforme
- Distance de nage

*Figure 12 : Test de la piscine de Morris. Cercle de gauche (1) : piscine dont l'eau est rendue opaque par l'adjonction d'un colorant. et apparaissant homogène pour le rat. (2) Cibles des mesures du système de vidéo-analyse : plateforme et croissants d'intérêt. (3) cercle central : vidéo-trace d'un rat lors du premier test d'apprentissage au premier jour. (4) et (5) cercels de droites : acquisition vidéo des tracés de nage de 2 rats différents au dernier test du 4<sup>e</sup> jour d'apprentissage.*

**Objectif :** le test de la piscine de Morris a comme objectif de tester les capacités d'apprentissage et de mémorisation spatiales des rats.

**Méthode :** Pour cela, au sein d'une piscine d'un diamètre de 1,30 m, la localisation d'une plateforme immergée à 1,5 cm sous le niveau de l'eau doit être apprise par les rats pendant une session de 90 secondes. Des marqueurs spatiaux sont affichés aux murs et visibles depuis toutes les parties de la piscine.

**Mesures :** à l'aide d'un système d'acquisition vidéo, la distance totale parcourue en 90 secondes et la latence avec laquelle la plateforme est trouvée, sont mesurées.

Methodes : l'apprentissage débute en positionnant le rat sur la plateforme pendant 30 secondes. Puis tous les autres tests d'apprentissage sont réalisés en plaçant le rat, aléatoirement, dans un des quadrants de la piscine et en le laissant nager pour trouver la plateforme immergée. Chaque test s'interrompt soit quand le rat a trouvé la plateforme où il est laissé 10 secondes, soit quand les 90 secondes se sont écoulées auquel cas, le rat est positionné, à nouveau pendant 10 secondes, sur la plateforme. Les rats sont ensuite retirés de la piscine, séchés et placés sous lampe chauffante avant d'être remis dans leur cage d'origine en attendant le test suivant. Le test d'apprentissage est débuté au 5<sup>e</sup> jour post LFPI, avec 3 sessions d'apprentissage espacées de 3h pendant 4 jours consécutifs.

Le test de remémoration (ou rétention-RET) est effectué à distance de l'apprentissage, idéalement plusieurs semaines après le LFPI. Il consiste à positionner le rat dans le cadran opposé à la plateforme et à mesurer la distance de nage et la latence avec laquelle le rat trouve la plateforme, s'il la trouve, pendant une session de 90 secondes. Ce test est répété 3 fois dans la même journée avec un espacement de 3 heures entre les tests. Le contrôle de la température de l'eau est un élément essentiel pour l'interprétation des résultats et l'analyse scrupuleuse des études montre que les températures varient de 20 à 30°C.

Résultats attendus :

Un LFPI de 2,7-3,0 atm induit un trouble de l'apprentissage spatial qui reste significatif tout au long de la première année après le traumatisme (Pierce 1998).

Pierce et al, testant cette phase de remémoration seulement 2 jours après les phases d'apprentissage n'a pas été en mesure de montrer une différence entre le groupe des rats traumatisés et ceux non traumatisés (Pierce 1998). Gurkoff et al ont retrouvé des modifications de l'apprentissage spatial après LFPI (entre 2,6 et 3,2 atm), sans effets sur la mémorisation et sans correspondance avec la densité neuronale de la région CA3 de l'hippocampe (Gurkoff 2003).

Sanders a montré qu'un LFPI de 1,0-1,4 atm n'induisait pas de troubles d'apprentissage ou de remémoration 1 ou 8 semaines après le traumatisme alors que des niveaux de traumatismes modéré (1,8-2,1 atm) et sévères entraînaient des troubles de la mémorisation proportionnelle au niveau de traumatisme (Sanders 1999). Par contre, ces auteurs ne retrouvaient pas de corrélation avec le LTP au niveau de la région CA1 de l'hippocampe (Sanders 2000). Dans tous les travaux de l'équipe de Chopp et Xiong, les troubles mnésiques ne concernent que l'apprentissage et pas la remémoration (Xiong 2010, Mahmood 2006, Ning 2011, Meng 2011).

Pourtant, la meilleure pratique requiert d'espacer le test de remémoration de plusieurs semaines par rapport aux phases d'apprentissage. Nous avons attendu 8 semaines entre les phases d'apprentissage et de remémoration. Aucune étude n'a procédé ainsi pour évaluer les effets du LFPI chez le rat.

#### 6.3.2.2.1. *Autres tests de mémorisation*

Après un LFPI mineur (1,0-1,5 atm), Hogg et al. ont rapporté des troubles de l'apprentissage passif ou actif avec stimulation aversive du 5 au 10<sup>e</sup> jour après le traumatisme (Hogg 1998). Les deux tests ont montré une altération des tests d'apprentissage mais les rats ayant subi le traumatisme développaient de meilleures performances d'échappement au test d'apprentissage actif. Dans le cadre du test d'apprentissage passif, les rats traumatisés évitaient beaucoup moins le secteur lumineux, se comportant comme dans une phase exploratoire ou de désinhibition (Hogg 1998). D'autres modèles d'apprentissage ont été étudiés comme des systèmes d'apprentissage avec récompense ou au contraire avec des séquences aversives, mais nous ne les détaillerons pas ici et renvoyons le lecteur à une revue générale publiée sur le sujet (Fujimoto 2004). Des apprentissages conditionnant ou non, des reconnaissances d'objet (OR) ont été évalués après TC expérimental. Nous en avons détaillé quelques uns dans l'approche neuroprotectrice par l'Epo-rh dans le premier chapitre. Wheaton et al ont montré la grande diversité des approches méthodologiques rendant les conclusions difficiles à tirer pour l'ensemble des études (Wheaton 2011). Mais, depuis la fin des années 1990, rares sont les études à avoir tenté de prouver un effet neuroprotecteur d'une molécule à partir du modèle de TC par LFPI basé sur les tests neurocomportementaux ou sur des tests mnésiques. Pillay et al ont montré une différence visible seulement au premier test de remémoration effectué une dizaine de jours après l'apprentissage, soit 14 jours après un LFPI d'intensité variable (Pillay 2005).

#### 6.3.2.3. Effets sur l'anxiété : Test d'exploration aquatique (WET)

Objectif : Le test d'exploration aquatique (WET) est un test d'exploration de l'anxiété et de l'hyperactivité motrice.

Méthode : Le WET consiste à faire nager simultanément 4 rats dans les 4 cadrans de la piscine de Morris délimités par des parois opaques et infranchissables pendant une durée de 300 secondes. A l'aide d'un système d'acquisition vidéo, on obtient un tracé délimité par une

zone totale constituée par le croissant de la piscine et d'un croissant central (zone centrale) virtuellement situé à 15 cm des bords (figure 13).

Mesures : la distance totale de nage, le temps et la distance passés en nage à vitesse rapide sur l'ensemble du croissant et dans le croissant central, le nombre d'entrée en zone centrale et le temps et la distance de nage passés en zone centrale sont relevés grâce à un système d'acquisition vidéo automatique. Les tests d'exploration aquatique ont été effectués au 1<sup>er</sup>, 3<sup>e</sup>, 9<sup>e</sup> et 23<sup>e</sup> jour après le LFPI.

## Test d'exploration aquatique (WET)

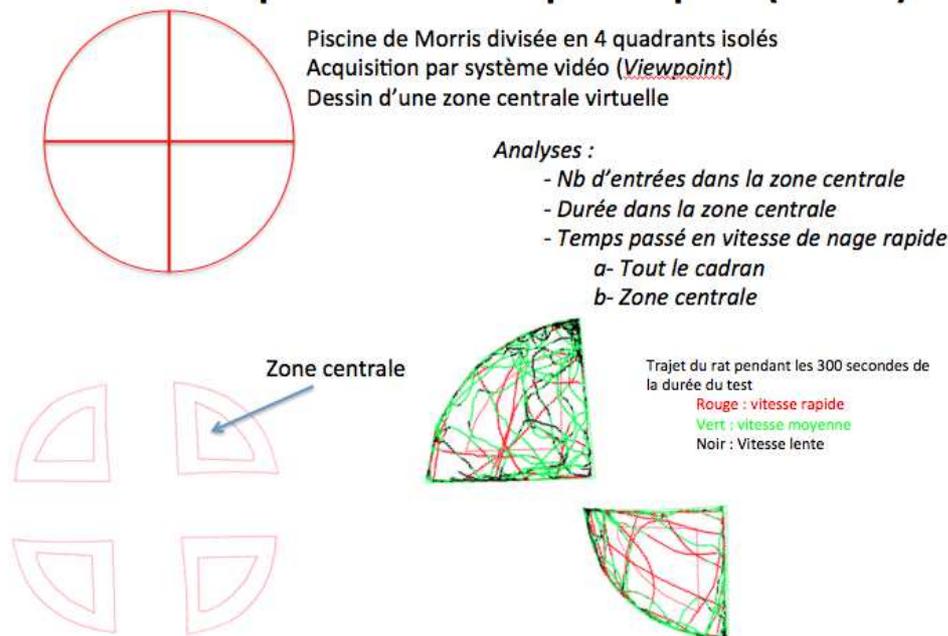


Figure 13 : exploration aquatique : en haut à gauche, piscine de Morris séparée en 4 quadrants égaux. En bas à gauche : vidéo analyse sur les quadrants et la zone centrale de ces quadrants définie à une distance d'environ 15 cm des bords. En bas à droite : tracés de 2 rats différents : explorations de la zone centrale à vitesse lente (noire), moyenne (verte) et rapide (rouge).

Résultats attendus : Des éléments indirects évoquent un trouble du comportement anxieux que nous pouvons entrevoir dans les études sur l'apprentissage passif ou actif avec stimulations aversives (augmentation de la vitesse de déplacement, hyperlocomotion) (Hogg 1998). Mais ces résultats n'étaient pas interprétables ou n'ont pas été interprété à partir de ces paradigmes expérimentaux. Les études ayant testé l'anxiété ont utilisé soit une cryolésion (Siren 2006), soit un LFPI (Li 2006, Jones 2008). Les tests utilisés ont été le test en champs ouvert (Open Field), le T-Maze (labyrinthe en T), l'« Elevated Plus Maze » (EPM-Labyrinthe surélevé en croix). Nous renvoyons le lecteur pour la validité de ces tests à la revue générale de Carobrez (2005). L'ensemble de ces tests a été interprété en terme de distance totale parcourue, vitesse moyenne de déplacement, de nombre d'entrées et temps passé dans les bras ouverts ou fermés

de l'EPM. Après un LFPI sévère (3,5 atm), dans l'OF, les rats tendent à entrer moins souvent dans la zone centrale, à y passer moins de temps sans pour autant diminuer leur distance parcourue (Jones 2008). Après un LFPI modéré (1,4 atm) chez la Gerbille, les distances totales parcourues augmentent au cours des 7 jours suivant le traumatisme (Li 2006).

Pour l'EPM, les rats réduisent le temps passé et le nombre d'entrées dans les bras ouverts (Jones 2008). Ces différences, entre les rats après LFPI ou non traumatisés, sont statistiquement significatives à 1 et 3 mois après le traumatisme, mais disparaissent au 6<sup>e</sup> mois (Jones 2008).

#### 6.3.2.4. Effets sur l'humeur ou le comportement dépressif

Objectif : l'évaluation de l'humeur doit passer par un comportement d'abandon dans une situation stressante. L'évaluation de l'hédonisme doit utiliser un système de réconfort émotionnel pour continuer d'affronter une situation stressante.

Méthodes : Deux tests ont été principalement étudiés chez les rongeurs pour évaluer un syndrome dépressif : le test de nage forcé, où dans un cylindre de 30 cm de diamètre et d'une hauteur de 40 cm remplis d'eau, les rats nagent pendant 15 minutes (Porsolt 1978).

Mesures : Les temps d'immobilité sont interprétés comme des comportements d'abandon dans une situation sans échappatoire et tradiraient un comportement dépressif.

Le test de préférence au sucrose permet de tester l'hédonisme. Si le rat choisit la boisson sucrée en situation de stress, c'est qu'il a besoin d'un renfort émotionnel positif. Sinon, il choisit la boisson dont il est le plus proche, eau ou sucre aléatoirement.

Résultats attendus : Hogg a montré que les rats ayant eu un LFPI de 1,0-1,5 atm développaient des troubles identifiés comme dépressifs 7 jours et 90 jours après le traumatisme (Hogg 1998). Jones, pour un LFPI de 3,5 atm retrouve une augmentation du temps en immobilité chez les rats traumatisés par rapport aux rats non traumatisés (Jones 2008). Jones a également montré que le test d'hédonisme ne permettait pas d'identifier les rats ayant eu un LFPI sévères (Jones 2008).

Au total, on peut retenir que les troubles comportementaux ont été largement démontrés depuis 20 ans après LFPI. Des troubles sensorimoteurs et de la mémoire (apprentissage et remémoration) ont été largement inventoriés mais la composante subjective de l'observateur et la pertinence des résultats sont en voie de disparaître depuis que des moyens automatiques de mesures ont été développés. Les tests portant sur les troubles anxio-dépressifs, qui

dominant chez l'homme après TC mineurs, pourraient être simplement transitoire et doivent être plus complètement étudiés.

### 6.3.3. Effets de l'Epo-rh sur les troubles cognitifs après TC

Seulement 2 études ayant utilisé l'Epo-rh après TC expérimental, ont été retenues pour être présentées dans la méta-analyse de Wheaton (Lu 2005, Yatsiv 2005) sur les différents agents pharmacologiques potentiellement neuroprotecteurs (Wheaton 2011). Les études ayant retrouvé des effets de Epo-rh sur les troubles neurocomportementaux avec des scores composites et les tests neurocomportementaux n'ont jamais été effectués au delà du 35<sup>e</sup> jour. Un test de reconnaissance d'objet nouveau, après CHI latéralisé, était corrigé par Epo-rh précocément (J3) mais l'Epo-rh n'apportait plus de bénéfice à J8 (Yatsiv 2005).

L'Epo-rh ou la CEPO améliorait les scores d'apprentissage au test de Morris effectué entre le 31<sup>e</sup> et le 35<sup>e</sup> jour après CCI (Mahmood 2007, Meng 2011, Ning 2011, Xiong 2010, Zhang 2010). Après une phase d'apprentissage précédant le traumatisme, Lu et al, ont montré que le temps passé dans le cadran où était placé aléatoirement la plateforme était supérieur pour les rats ayant reçu de l'Epo-rh entre J1 et J14 après un CCI (Lu 2005).

A notre connaissance, aucune étude n'a pu montrer un effet de l'Epo-rh sur la récupération des fonctions neurocomportementales après TC par LFPI.

#### 6.3.3.1. Histologie

L'analyse histologique est une mesure d'un paramètre intermédiaire des effets neuroprotecteur d'une thérapeutique. Les différents moyens de mesure des lésions histologiques induites par un TC sont

- a- Le volume lésionnel
- b- Les marquages, spécifiques ou non, avec des comptes cellulaires

Cependant, quasiment aucune étude n'a corrélié les données histologiques avec les résultats comportementaux voire électrophysiologiques (Sanders 2000, 2001). En général, les études ont considéré que les lésions histologiques permettaient de suspecter une corrélation avec les troubles neurocomportementaux induits par le TC expérimental. Par déduction, les auteurs ont imaginé que cette corrélation pouvaient avoir un aspect bénéfique chez l'homme.

a- Volume lésionnel et intensité de la lésion initiale

Quelques d'études se sont penché sur la caractérisation du volume lésionnel induit par différents niveaux d'intensité du traumatisme initial par LFPI. Cortez et al pour le LFPI (1989) ont montré que la cavitation résiduelle était maximale 2 semaines après le LFPI pour réduire progressivement à la 4<sup>e</sup> semaine post LFPI (Cortez 1989). Plusieurs auteurs travaillant étroitement avec le promoteur du modèle de LFPI ont décrit largement les lésions retrouvées après différents niveaux d'intensité de LFPI (McIntosh 1989, Hicks 1993, 1996, Pierce 1998, Soares 1995).

Brines a montré que l'Epo-rh réduisait le volume lésionnel après un CCI (Brines 2000). Cherian et al ont également retrouvé une réduction du volume lésionnel après injection d'Epo-rh au décours CCI très sévère (Cherian 2007). Ces auteurs montraient également que le délai d'administration de l'Epo-rh pouvait être retardé jusqu'à 9h après le CCI, avec un efficacité au moins partiellement conservée. En revanche, Ning a récemment montré que, l'administration retardée d'Epo-rh de 6h à 24h après un CCI, ne changeait pas les effets favorables neurocomportementaux de l'Epo-rh alors que l'efficacité sur le volume lésionnel avait disparu.

Aucune étude n'a montré les effets favorables de l'Epo-rh sur le volume lésionnel après LFPI.

b- Les modalités de colorations histochimiques ou immunohistochimiques et comptes cellulaires varient énormément entre les études. Les études princeps (Cortez 1989, McIntosh 1989, Marmarou 1994) ont utilisé en général des marqueurs indirects (Hématoxyline/Eosine, Thionine/Nissl (Hicks 1996), Crésyl-violet (Hellmich 2007), Acide fuschin (Hicks 1996) Argent (Hicks 1996), Fluorjade-B (Hellmich 2005), APP et Tau (Spain 2010). Rares sont les études à avoir utilisé une coloration spécifique des neurones comme le NeuN (Hogg 1998, Hellmich 2005, Gurkoff 2006, Xiong 2010, Ning 2011, Meng 2011). Pourtant ces auteurs n'ont, en général pas retrouvé de diminution du nombre de neurones sauf pour Hogg mais les dénombrements étaient peu informatifs en terme de localisation au niveau des différentes structures cérébrales (Hogg 1998) ou semi-quantitatifs (Xiong 2010, Meng 2011, Ning 2011). Hellmich et al, dans 2 papiers distincts (2005, 2007) plutôt focalisés sur la validation des colorations fluorjade-B n'ont pas analysé les données chiffrées des coupes histologiques acquises pour NeuN. A l'opposé, Gurkoff et al ont montré qu'ils ne trouvaient pas de diminution du nombre de cellules marquées en NeuN après LFPI. Cependant l'analyse portait sur l'ensemble du cortex alors qu'il est très probable que la mort neuronale si elle a lieu porte sur une surface plus faible que celle analysée dans leur étude (McIntosh 1989, Cortez 1989,

Hicks 1993). Noyée dans le compte cellulaire cortical, leurs résultats n'ont pas été significatifs.

En effet, la localisation des lésions neuronales est variable selon le modèle étudié et selon l'intensité du traumatisme infligé.

Enfin, tant les délais de sacrifice que les structures analysées modifient significativement les résultats obtenus en particulier pour le Fluorochrome B (Sato 2001, Hellmich 2005, 2007). Néanmoins, pour cette dernière coloration, on a longtemps pensé qu'elle pouvait permettre l'identification de lésions cellulaires en voie de dégénérescence. Or il est maintenant admis que cette coloration n'a pas la spécificité souhaitée pour les neurones car elle marque également les astrocytes et non les neurones dans la moelle épinière, avant ou après traumatisme médullaire. Donc les cellules en dégénérescence identifiées par coloration en Fluorochrome ne sont pas spécifiquement des neurones.

#### 6.3.3.2. Biologie moléculaire et protéique

Comme nous l'avons vu dans la première partie sur les réponses inflammatoires après traumatisme du système nerveux central, différents auteurs ont montré que tant le LFPI pour les traumatismes encéphaliques qu'après traumatisme médullaire par impaction ou compression, la réponse inflammatoire est précoce et réversible et variable selon les protéines analysées. Après TC expérimental, il existe une augmentation de la réponse inflammatoire qui a pour objectif d'une part d'attirer des cellules immunocompétentes (polynucléaires, macrophages, monocytes) pour organiser la lutte contre les effets cellulaires du traumatisme (rôle des chimiokines) et d'autre part activer les cellules localement (astrocytes, microglies), pour les rendre résistantes ou les éliminer des tissus (cytokines).

##### 6.3.3.2.1. *Chimiokines : MCP-1 et MIP-2*

Les chimiokines sont des cytokines de faibles poids moléculaire qui jouent un rôle central dans la transmigration vasculaire et l'accumulation de certains sous-type de leucocytes au sein du parenchyme cérébral lésé. Cette famille moléculaire contient environ 50 ligands et 20 récepteurs répartis en 4 familles en fonction de leur structure (Ambrosini 2004).

##### MCP-1 ou CCL2 (chemotactic capacity ligand-2)

La classe des chimiokines MCP (monocyte chemoattractant protein) comprend 5 molécules qui ont comme fonction d'attirer différents types de leucocytes de la circulation sanguine vers le parenchyme cérébral. Les cellules cibles de la MCP-1 sont les macrophages et monocytes circulants mais MCP-1 est aussi capable de recruter des lymphocytes T, des

cellules NK et d'activer les astrocytes ainsi que les cellules microgliales. Cette activation a été montrée *in vitro* sur cellules isolées mais aussi par le biais de souris génétiquement déficientes en MCP-1, qui s'avèrent incapables de recruter des monocytes après un stimulus inflammatoire, ceci malgré un nombre de leucocytes circulants normal (Lu 1998).

Pour activer le recrutement d'un monocyte, deux MCP-1 doivent se fixer sur un récepteur couplé à une G-protéine qui est alors internalisé. Un processus classique d'activation cellulaire basé sur les protéines MAPK et protéine kinase C est mis en jeu conduisant à la diapédèse monocyttaire.

Au niveau cérébral, les cellules non leucocytaires sur lesquels des récepteurs MCP-1 (CCR2) ont été identifiés sont les neurones, les astrocytes, les cellules microgliales, et les cellules endothéliales cérébrales. Le niveau d'expression du CCR2, en situation physiologique est bas mais est très rapidement augmenté lors de situations inflammatoires. Cependant, une infiltration inflammatoire persiste dans des modèles transgéniques, mais apparaît beaucoup plus tardivement (J15) chez les animaux déficients en CCR2.

Les principales sources de MCP-1 au niveau cérébral sont les mêmes que celles porteuses du CCR2 : astrocytes, cellules microgliales, macrophages migrants et cellules endothéliales cérébrales. En situation d'ischémie, les neurones peuvent se transformer en cellules synthétisant MCP-1 (Che 2001, Gourmala 1997). Cette synthèse est déclenchée par de nombreux facteurs dont la présence d'interleukine-1B et le TNF $\alpha$ , alors qu'au contraire, les oestrogènes et les corticoïdes ont tendance à inhiber la synthèse de MCP-1. Après un TC-LFP, le pic de sécrétion de la protéine MCP-1 se situe autour de la 8<sup>e</sup> heure post-trauma (Rhodes 2009, Semple 2010). Par contre, le pic du transcrit de MCP-1 est plus précoce (2<sup>e</sup> heure) même si les méthodes pour le mettre en évidence manquaient de sensibilité et de spécificité à l'époque.

MCP-1 a comme effet non monocyttaire de favoriser la différenciation cellulaire, d'augmenter l'excitabilité neuronale (Guyon 2009). Pour ce qui concerne le TC, les effets principaux de MCP-1, outre le recrutement monocyttaire, sont de majorer la perméabilité vasculaire de l'encéphale par l'intermédiaire des cellules endothéliales cérébrales. Ces cellules ont un rôle pivot dans la réponse inflammatoire oedémateuse.

Chez l'homme, les concentrations de MCP-1 dans le liquide céphalo-rachidien sont significativement plus élevées aux cours des 3 jours suivant un traumatisme crânien grave (GCS < 8) que dans les LCR contrôle de patients non traumatisés (Semple Morganti 2010).

### Macrophage Inflammatory Protein (MIP) (Interleukine-8 chez l'homme)

Cette classe de chimiokines comprend au moins 3 sous types de molécules : MIP-1 et MIP-2, la première ayant des spécificité MIP-1 $\alpha$  et MIP-1  $\beta$ . Dans cette catégorie de chimiokines, on retrouve l'IL-8 correspondant chez l'homme de MIP-2 chez le rongeur. MIP-2 agit essentiellement sur les neutrophiles alors que le MCP-1 a un pouvoir d'attraction sur les macrophages. Les chimiokines ont été d'abord pensées comme étant constitutives ou inflammatoires. Depuis quelques années, on sait qu'elles sont finement régulées au niveau cérébral, participant en conditions physiologiques au développement et à l'homéostasie cérébrale par des mécanismes de migration des progéniteurs neuronaux, de neurogenèse, de collaborations intercellulaires et de migrations cellulaires. Ces chimiokines agissent également en renforçant l'inflammation en conditions pathologiques par l'augmentation de l'attraction leucocytaires, l'activation microgliale, l'angiogénèse et la lutte contre l'infection virale ou les cellules tumorales (Ambrosini 2004). Comme pour MCP-1, la synthèse de MIP-2 est augmentée par l'adjonction de TNF $\alpha$ , d'IFN $\gamma$  ou d'IL-1  $\beta$  isolément ou en association (Turbic 2011). Cette synthèse est augmentée par un LFPI de 1,6-1,8 atm (Rhodes 2009) mais aussi par d'autres stimuli comme l'ischémie ou les processus neuroinflammatoires. Les sources principales de MIP-2, en conditions pathologiques, semblent provenir non seulement des neutrophiles mais aussi des astrocytes et des cellules microgliales (Ambrosini 2004). On retrouve des récepteurs à MIP-2 sur toutes les lignées cellulaires de l'encéphale (cellules endothéliales, microgliales, astrocytaires, neuronales et oligodendrogiales) sans compter les cellules migrantes que sont les polynucléaires. Après TC expérimental, le pic de sécrétion protéique de MIP-2 varie en fonction des structures encéphaliques (voir tableau).

Chez l'homme, les concentrations d'IL-8 (analogue humain de MIP-2 chez le rat) dans le LCR sont significativement augmentées pendant les 18 jours de suivi des patients (Lenzlinger 2001) alors qu'elles sont quasiment nulles chez les patients contrôles.

#### 6.3.3.2.2. *Interleukine-1 $\beta$ et Interleukine-6*

Les interleukines sont des protéines appartenant à une superfamilles de protéines appelées cytokines. Elles ont des activités pro- ou anti-inflammatoires. Parmi cette superfamille, la famille des IL-1 $\beta$  est l'une des plus connues car elle est considérée comme ayant un des plus puissants effets pro-inflammatoire et pro-apoptotique. La famille de cytokines IL-1 est constituée de 4 protéines : IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1r (récepteur) et IL-1ra (ou récepteur antagoniste).

Quel que soit le modèle d'agression cérébrale, les concentrations en ARNm ou en protéine IL-1 $\beta$  sont augmentées précocement et de façon plus ou moins prolongée dans tous les modèles de TC expérimentaux. Une augmentation du taux en ARNm ou de protéine IL-1 $\beta$  est observée dès l'agression et se prolonge pendant 1 à 2 semaines après le TC. Il existe une variation entre les différentes structures pour ce qui est du délai de réponse inflammatoire maximum. Ainsi, Lu et al (2005) ont montré que le taux de l'ARNm augmentait dès la 3<sup>e</sup> heure après TC et était multiplié par 4 au niveau de l'hippocampe entre la 6<sup>e</sup> et la 12<sup>e</sup> h après un CHI. Ces auteurs montraient que la source principale d'IL-1 $\beta$  provenait des astrocytes. Enfin, ces auteurs mettaient en évidence que l'administration d'anticorps anti- IL-1 $\beta$  atténuait les effets négatifs observés après CHI.

#### 6.3.3.3. Moyens radiologiques

Sur le plan IRM, en fonction des séquences employées, on peut montrer la présence de lésions hypo ou hyperdense au niveau des images pondérées en T1 ou T2 dans différentes zones cérébrales évoquant respectivement un œdème (Pasco 2007) ou des hémorragies. Les images en diffusion (DWI) ou en Tenseur de diffusion (DTI), focalisées sur la substance grise ou blanche tendent à montrer la présence d'un œdème, cytotoxique ou vasogénique, précoce ou retardé, secondairement suivi de ruptures axonales quel que soit le modèle de TC expérimental employé (VanPutten 2005, Albenzi 2000, McDonald 2007, Lescot 2010, Van den Looij 2011, Verdonck 2007). Des études ont montré que les altérations précoces de l'ADC, dans le premier mois après le LFPI, prédisaient les altérations tardives observées au 11<sup>e</sup> mois post TC pour des LFPI sévères (Immonen 2009). Enfin, de nouvelles méthodes d'évaluation du volume sanguin cérébral rapportent des variations importantes au niveau des différentes structures parenchymateuses comme le cortex, l'hippocampe (Immonen 2010) prédisant également le devenir histologique. Par contre, ces mesures ne sont pas nécessairement couplées avec les évaluations comportementales (Liu 2011). D'autres méthodes d'imagerie comme le PET-scan au FDG ont montré une diminution prolongée du métabolisme du glucose au niveau du cortex traumatisé, diminution qui reste mesurable pendant les 14 jours suivant le traumatisme (Liu 2011).

Dans le tableau suivant sont présentés les principales études sur l'IRM et le TC expérimental. Nous avons mentionné les contraintes lésionnelles appliquées, les espèces choisies par les expérimentateurs, et la taille des régions d'intérêt. En effet, bien que souvent mentionnées dans le corps du texte en terme de région d'intérêt sur lesquels les mesures en particulier de

ADC ou DTI sont réalisées, le nombre de pixels n'est quasiment jamais mentionné. Enfin, nous avons relevé les analyses et les scores cliniques évalués quand ils l'ont été.

Année	Auteur	Espèce	Modèle	Contraintes traumatique	Mortalité	Suivi	Taille ROI	Mesures	Score clinique
2007	McDonald	Souris	CCI	5m/s ; 2,5 mm	NA	J1	NA	FA, ADC, L1, L2, L3	NA
2007	McDonald	Souris	CCI	5m/s ; 2,5 mm	NA	J28	NA	FA, ADC, L1, L2, L3	NA
2008	Casey	Rats P17	CCI	5 m/s ; 1,5 mm, 50 ms	NA	J14	NA	Spectro	NA
2009	Onyszchuk	Mice	CCI	1,5m/s ; 1 mm ; 85 ms	NA	J14	NA		SeMo
2010	Immonen	Rats	CCI	3 m/s ; 3 mm ; 50 ms	NA	J14			mNNS
2011	Jiang	Rats	CCI	NA	NA	J14	NA	T2, FA, ADC	NNS + MSp
2007	Obenaus	Rats	LFPI vs CCI	2,7 vs NA	NA	J7	NA	T2q, DWI	
2002	Albensi	Rats	LFPI	2,0	NA	14D	NA	RARE, ADC	NNS
2005	VanPutten	Rats	LFPI	2,25		1W	NA	T2, ADC	
2009	Immonen	Rats	LFPI	2,95	25%	7M	NA	T2q, DWI	MWM
2009	Immonen	Rats	LFPI	2,95	NA	11M	NA	T2, T2*, DWI	
2009	Kharashvili	Rats	LFPI	2,0 vs 3,1	NA	J14	NA	T2q	SeMo + MWM
2011	Hayward	Ras	LFPI	3,3	NA	J14	NA	CBF, CBV	
2011	Liu	Rats	LFPI	3,4	NA	6M	NA		Anx + MWM
2007	Pascot		LFPIIm	2,0	NA	J7	NA	T2, FLAIR, DWI, DSC	
2010	Lescot	Rats	LFPIIm	1,6-1,8	33%	J3	NA		
2008	Verdonck	Rat	CHI	500g/1,5m	45% (VS), 15% (VA)	H6	NA	T2, RARE, ADC	
2011	VandeLooj	Rat	CHI	500g/1,5m	NA	H2	NA	FA, ADC,	

Tableau 11 : TC expérimental, IRM-DTI (délais et méthodes), mortalité et suivi neurocomportemental. SeMO : tests sensitivo-moteurs, NNS : Neuroscore, MWM : Test de Morris, NA : non acquis.

Les difficultés quant à l'interprétation de l'ensemble de ces données entre les études tiennent en plusieurs points : i) les régions d'intérêt sont rarement superposables, ii) la taille des régions d'intérêt est très variable et exceptionnellement mentionnée, iii) les comparaisons et

les états de base ne sont pas toujours clairement définis (coté controlatéral, contrôle opéré, contrôle naïf), iv) la mortalité des conditions d'étude ne permet pas toujours de décrire la sévérité du traumatisme *a priori*, v) les protocoles de mesures sont rarement superposables, le suivi est variable, vi) les études histo-comportementales associées à l'IRM sont rarement homogènes entre les études et au sein même des équipes, vii) aucune étude n'a concerné le TC mineur induit par un modèle de LFPI car la majorité des études ont utilisé des modèles avec des TC expérimentaux sévères à majeurs.

#### 6.3.3.4. Traumatisme crânien expérimental et Epo-rh

Nous avons montré dans la première partie de ce travail que les travaux portant sur le traumatisme crânien expérimental s'étaient focalisés principalement sur des objectifs qu'on peut qualifier d'intermédiaires dans la perspective où la neuroprotection doit avant tout viser à une récupération fonctionnelle clinique. Cependant, il existe de multiples arguments biologiques ou en IRM soutenant le fait que, sur le rat, après TC expérimental les effets produits par l'Epo-rh apportent des gains sur des paramètres inflammatoires précoces et tardifs, apoptotiques, vasculaires que ce soit sur la BHE ou l'œdème cérébral, ou enfin favorisant les effets de la neurogenèse.

Parallèlement, plusieurs équipes ont montré les effets d'un TC expérimental en particulier d'un LFPI sur les troubles du comportement. Beaucoup plus rares ont été celles montrant des effets favorables de l'Epo-rh ou de ces dérivés sur ces variables. Aucune des équipes n'a travaillé sur le modèle LFPI pour identifier les effets neurocomportementaux potentiellement bénéfiques de l'Epo-rh.

TC	Année	Auteur	Anesthésie		N/groupe	%Mort	Intensité (V, P, D, T)	GROUPES	Injections	Suivi	Neurocomportement
CCI	2007	Mahmmod	Chloral	Wistar	Male		4 ; 2,5 ; 6 ; -	Epo 5K/CEPO 50,	H6, H24	35D	MWM from D31-35
CCI	2005	Lu	Chloral	SD	Male	6*2	4 ; 2,5 ; 6 ; -	Epo 5K	D1, D4, D7, D14	D14	MWM learning D-5, memory D1-D14
CCI	2010	Xiong	Chloral	Souris	Femelle	6 à 10*3	4 ; 0,8 ; 3 ; -	Epo5K/CEPO	H6, D3, D7	D35	MWM (learning), FFT, mNNS
CCI	2009	Zhang	Chloral	Wistar	Males	8*3	4 ; 2,5 ; 6 ; -	saline/ Epo5K 24h48h72h	H24, H48, H72	D90	MWM (learning), FFT, mNNS
CCI	2011	Xiong	Chloral	Wistar	Males	8*4	4 ; 2,5 ; 6 ; -	CEPO x 1 vs CEPO x 3	H6 vs H6+H24+H48	D35	MWM (learning), FFT, mNNS
CCI	2011	Meng	Chloral	Wistar	Males	8*6	4 ; 2,5 ; 6 ; -	Epo1K, 3K, 5K, 7K, Sham, Naive	H24, H48, H72	D35	MWM (learning), FFT, mNNS
CCI	2011	Ning	Chloral	Wistar	Males	8*3	4 ; 2,5 ; 6 ; -	saline / Epo tot / Epo Tard	H6, H24, H48 vs H24, H48, H72	D90	MWM (learning), FFT, mNNS
CHI	2005	Yatsiv	NA	Souris	Male	7 à 10*4	NA	Epo 5K/TBI/Naive/TBI+Epo	H1, H24	D15	NNS (J1-J14), ORT (J3 et J8)
Cryo	2006	Siren	TBE	Souris	Male		60 sec, -183°, diam 1mm	Epo 5K	H0 et tous les jours 14D	M9	Hole Board, Rota-rod, Open field, EPM, MWM
Cryo	2007	Grasso	ISO	SD	Male	22*3	60 sec, -78°, diam 5mm	Epo 1K/8h for 48h or 14D	Toutes les 8h pendant 14j jours	D14	MWM D1-D14, Mean swim speed, latency

Tableau 12 : Etudes neuro-comportementales des effets de l'Epo-rh ou CEPO après TC expérimental. CCI : Cortical Controlled Injury, CHI : Closed Head Injury, Cryo : Cryolésion. Groupe : Nombre de rats \* Nb de groupes ; Mort : mortalité ; Intensité : V = vitesse ; P = profondeur d'excursion du piston ; D = diamètre du piston ; T = temps de compression ; GROUPES : Epo : Epo-rh ; 5K = 5000 UI/kg ; CEPO = Carbamylated-Epo ; D = days ; H = heure ; MWM = test de la piscine de Morris ; FFT = Foot Fault Test ; mNNS : neuroscore

## **7. ETUDE 3 ET 4 : NOS TRAVAUX PRECLINIQUES**

---

Nous avons montré dans la partie précédente qu'il existait de nombreuses publications sur les effets de différents modèles expérimentaux de TC sur les troubles sensori-moteurs, moins souvent sur les troubles cognitifs, plus rarement encore sur les troubles anxieux et très peu fréquemment des troubles comportementaux croisés avec l'évaluation d'anomalies mesurées par IRM en DTI. De même, il existe de très nombreuses publications sur les troubles histologiques et moléculaires et quelques études sur les troubles IRM-DTI après LFPI mais rarement les données ont été croisées entre les différents champs d'études.

Nous allons présenter maintenant les travaux que nous avons réalisés à l'aide du modèle LFPI chez le rat. Dans un premier temps, nous avons caractérisé les effets de ce modèle expérimental de TC en explorant les composantes inflammatoires, histologiques, neurocomportementales et par l'IRM en DTI.

Dans la seconde partie, nous avons étudié les effets de l'Epo-rh sur les paramètres significativement modifiés par le LFPI.

### ***7.1. Evaluations des effets cérébraux d'un LFPI (1,6-1,8 atm) : Etude 3***

Nous faisons apparaître sur la figure suivante le synoptique de l'expérimentation animale.

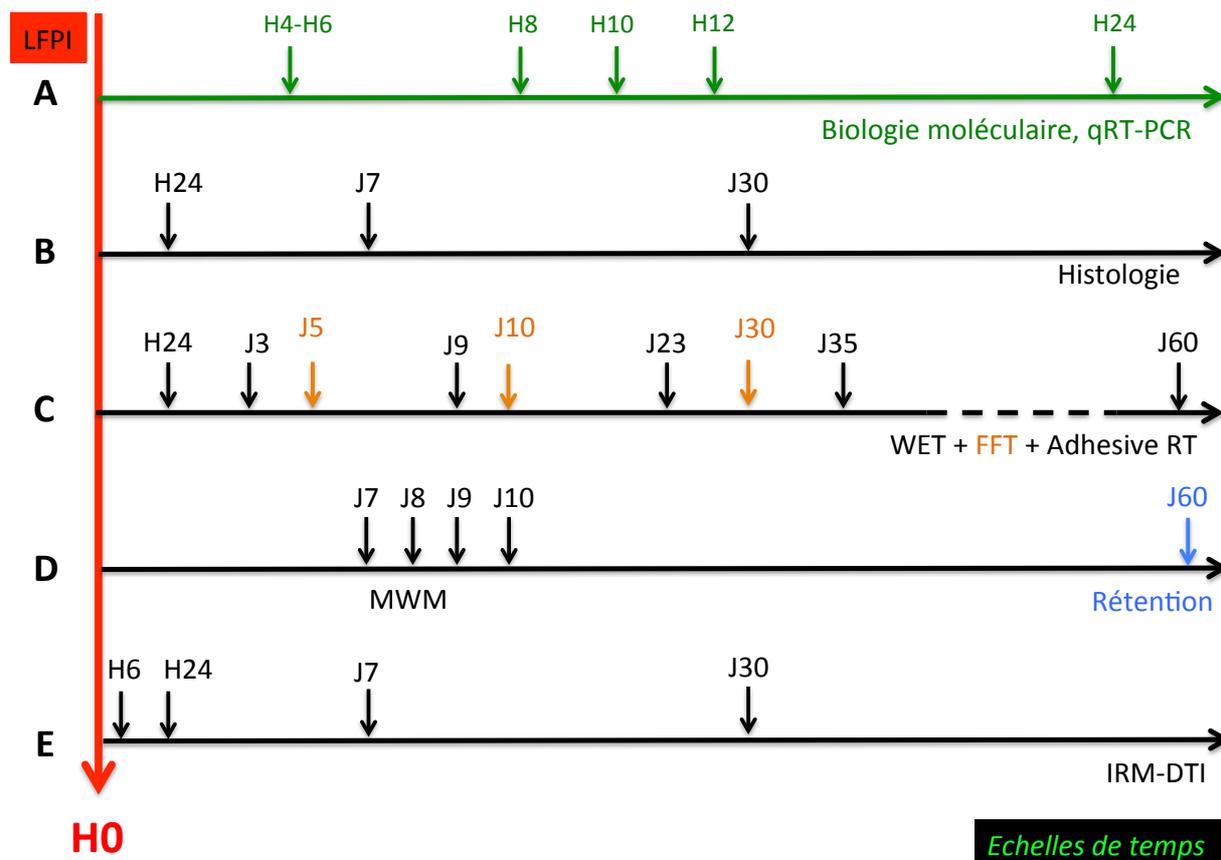


Figure 14 : Schéma de l'expérience animale réalisée : H0 correspond au LFPI, les flèches horizontales correspondent à l'échelle de temps après le traumatisme, les échelles verticales représentent les temps des évaluations en heures (H) ou jours (J) après le LFPI.

A = réponse inflammatoire et réactivité du système Epoergique. B = Lésions histologiques, mort neuronale et réactivité gliale. C = anxiété, fonctions sensori-motrices. D = apprentissage et mémorisation spatiale. E = IRM-DTI

Abréviations : qRT-PCR : amplification quantitative des ADNc par réaction de polymérisation en chaîne après transcription inverse des ARNm ; WET : Water Exploration Test, pour test d'exploration aquatique ; FFT : Foot Fault Test, pour test de faute de positionnement des pattes ; MWM : Morris Water Maze, pour labyrinthe aquatique de Morris ; Adhesive RT : Adhesive Removal Test, pour test de retrait d'adhésif ; IRM-DTI Imagerie par Résonance Magnétique en Tenseur de Diffusion.

### 7.1.1. Tests neurocomportementaux

#### 7.1.1.1. Tests sensori-moteurs

##### 7.1.1.1.1. Test de retrait d'adhésifs

Ce test a été réalisé à J5, J10 et J30. Les résultats obtenus avec le test de retrait d'adhésif n'ont pas montré de différence significative ni entre les groupes Sham et LFPI, ni entre les délais de retrait de l'adhésif, ni entre le côté choisi pour retirer l'adhésif en premier, ni entre les temps d'études. Les résultats ne sont pas présentés en graphique.

### 7.1.1.1.2. Test d'erreur de pattes ou Foot Fault Test (FFT)

Ce test avait les mêmes objectifs que le précédent. Par contre, il ne permettait pas de savoir quel était le côté déficient bien qu'un compte automatisé des erreurs fut plus pertinent. Il a été réalisé aux mêmes temps que le test de retrait d'adhésif.

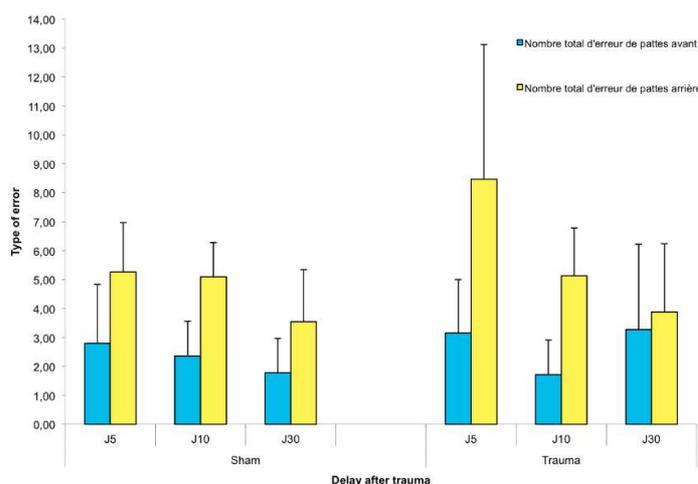


Figure 15 : Nombre d'erreurs de pattes avant et arrière chez les rats des groupes Sham et LFPI en fonction du délai après le traumatisme. Pas de différence entre les groupes ou entre les temps ( $n = 11$  par groupe, moyenne  $\pm$  SEM). Pas d'effets de l'apprentissage du test.

Il n'y a pas de différence entre les groupes LFPI et sham pas plus qu'entre les sessions traduisant un faible effet de l'apprentissage.

### 7.1.1.1.3. Résultats des tests de Morris et du WET

Par ailleurs, l'analyse de la vitesse de nage, de la distance totale parcourue au cours des tests de Morris ou du WET permet également de confirmer l'absence de troubles moteurs des rats soumis à un LFPI (1,6-1,8 atm) car elles sont non différentes entre les groupes LFPI et Sham. Nous en concluons qu'un LFPI de 1,6-1,8 atm n'a pas d'effet significatif sur les composantes sensori-motrices chez le rat. Ou bien, les tests employés ne sont pas en mesure d'authentifier un trouble sensitivo-moteur chez les rats malgré le recours à 3 différents tests d'évaluation : test d'erreur de patte (Foot Fault Test), test de retrait d'adhésif, et distance ou vitesse moyenne de nage.

### 7.1.1.2. Test d'apprentissage et de mémorisation spatiale

Les résultats aux tests d'apprentissage sont présentés dans les figures suivantes :

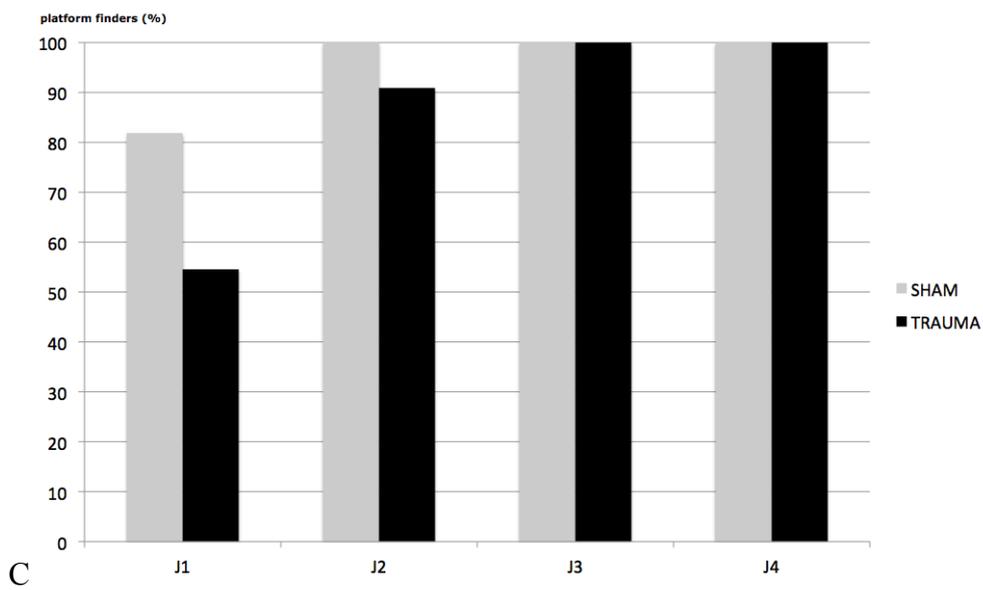
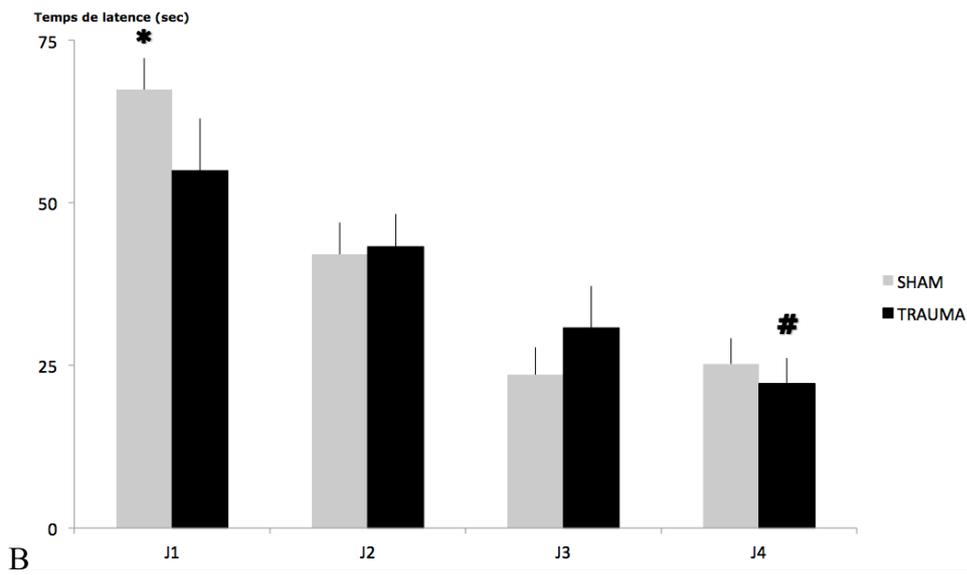
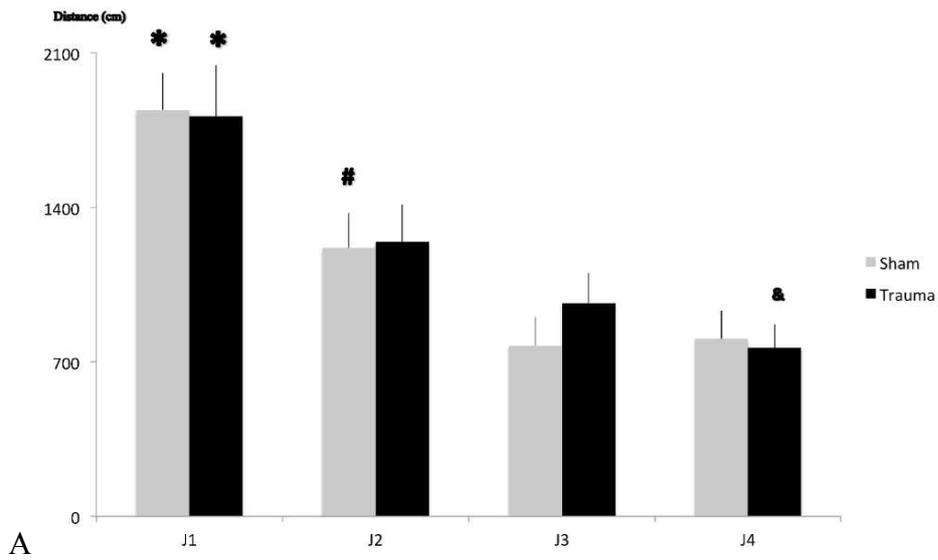
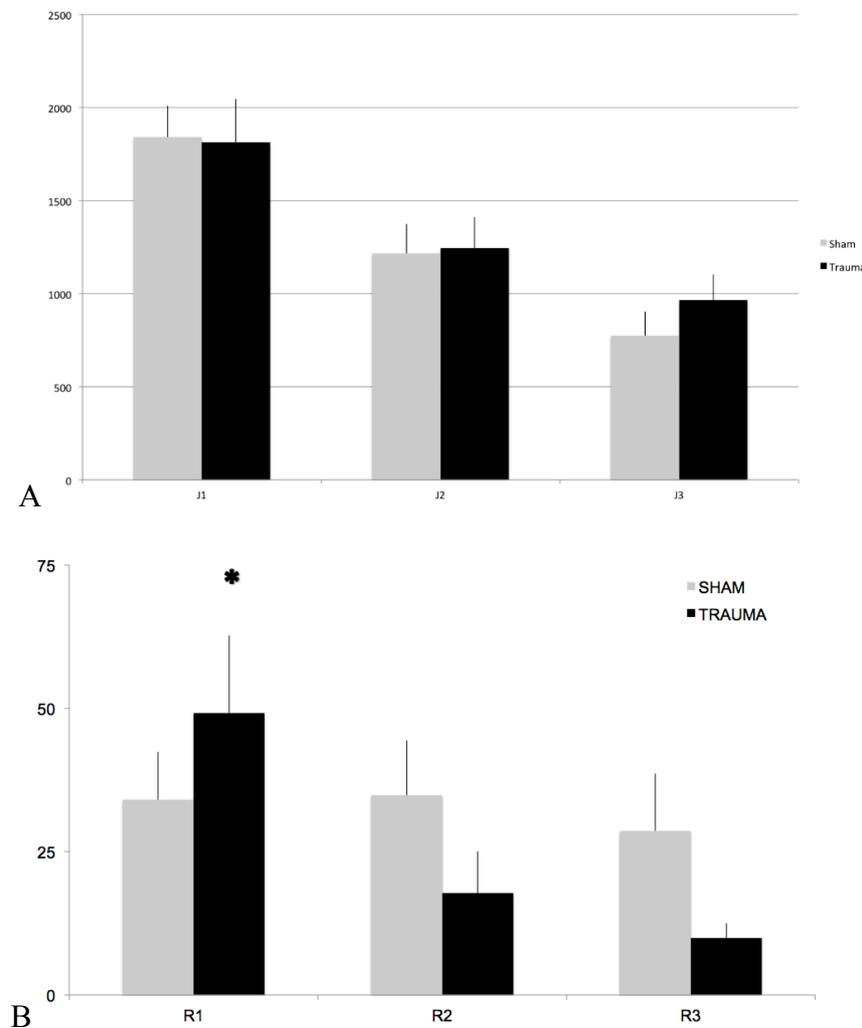


Figure 16 : (A) Distances (cm) et (B) latences (sec) moyennes pour atteindre la plateforme, des rats des groupes Sham ou LFPI (trauma) au cours des séances successives d'apprentissages (moyenne  $\pm$  SEM). (C) : pourcentage de rats ayant trouvé la plateforme au cours des apprentissages successifs. Pas de différence entre les groupes. \* :  $p < 0,05$  entre test J1 et autres temps ; # :  $p < 0,05$  entre test J2 et autres temps ; & :  $p < 0,05$  entre test J4 et test J2. ( $n = 11$  par groupe).

Il existe un effet de l'apprentissage marqué par une augmentation du nombre des rats qui trouvent la plateforme et par une diminution de la latence et de la distance de nage entre le moment où les rats sont positionnés dans la piscine et le moment où ils trouvent la plateforme. Cependant, cet effet n'est pas significativement différent entre les 2 groupes et il n'existe pas de différence entre les groupes sur aucune des variables analysées.

Au test de remémoration, les résultats sont également non significativement différents entre les groupes, pour ce qui est des distances ou latences moyennes nécessaires pour trouver la plateforme.



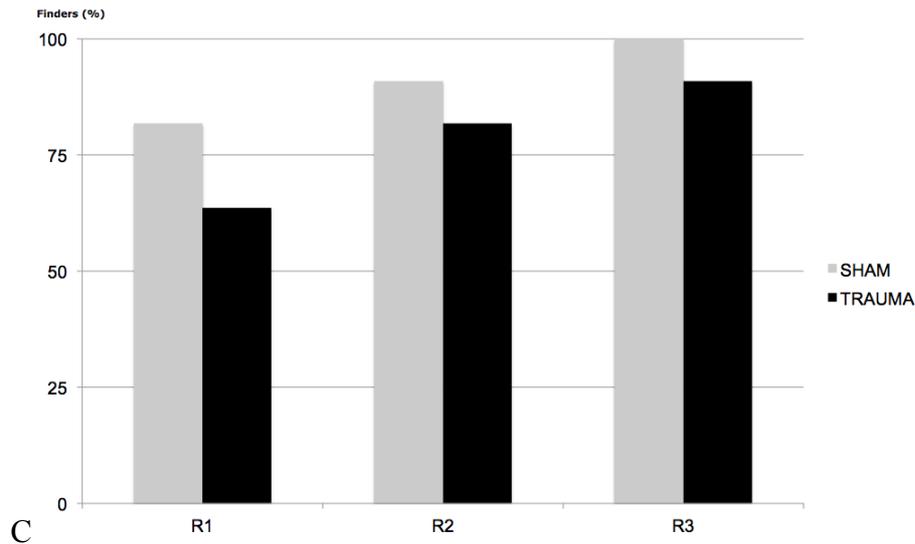


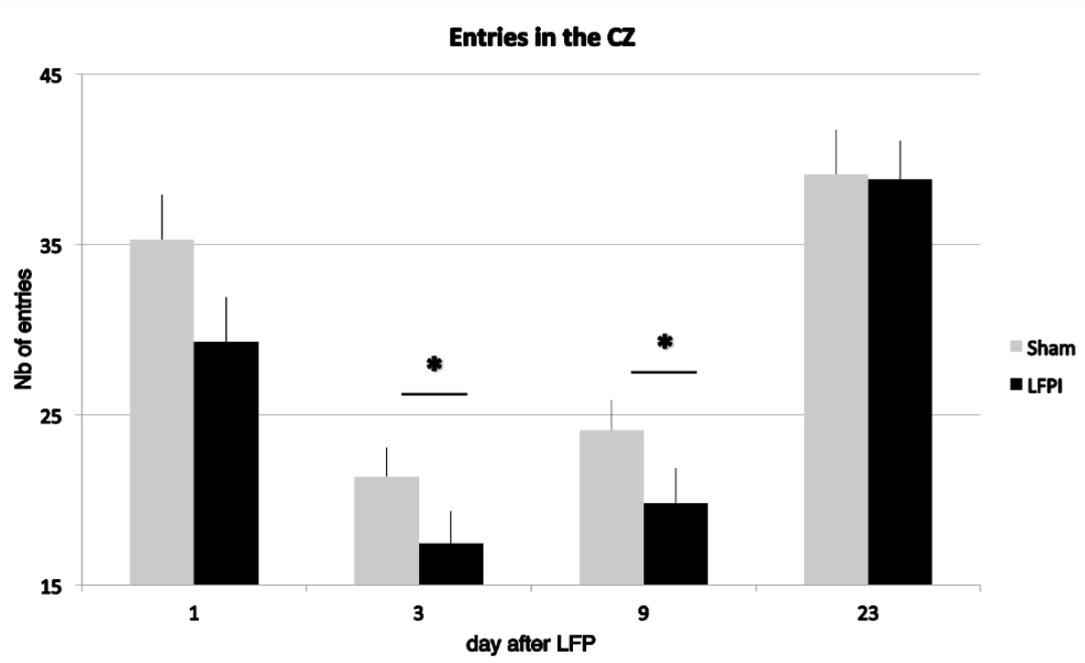
Figure 17 : Résultats obtenus aux 3 tests de remémoration (RET) effectués 60 jours après le LFPI. (A) : distances (cm) et (B) latences (sec) moyennes nécessaire pour trouver la plateforme (\* :  $p < 0,05$  entre le R1 et le R3 pour les rats LFPI) ; (C) : pourcentage de rats ayant trouvé la plateforme par rapport au nombre total de rats (NS). Pas de différence entre les groupes LFPI (Trauma) et Sham. ( $n = 11$  par groupe).

La distance diminue de façon significative au cours des tests de remémoration successifs mais sans aucune différence entre les groupes, avec ou sans LFPI. Des résultats équivalents sont retrouvés pour les latences. Enfin, il existe une courbe d'apprentissage entre les 3 temps d'évaluation pour les rats LFPI, mais non différente entre les 2 groupes, avec ou sans LFPI.

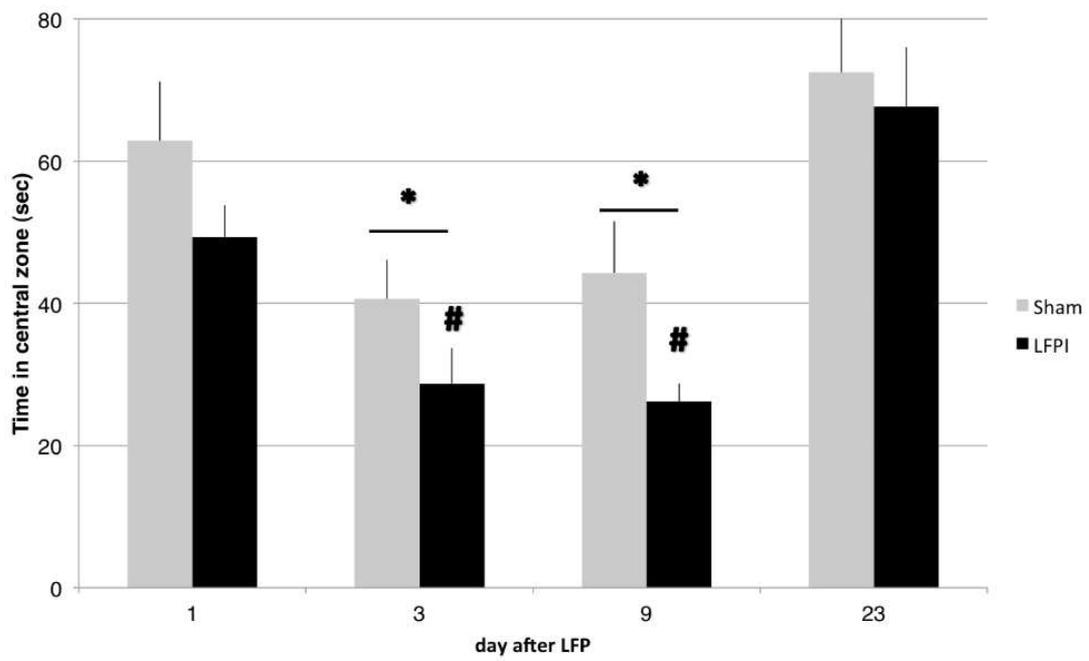
Nous pouvons conclure que 3 mois après le LFPI, les rats ne souffrent ni de troubles de l'apprentissage spatial précoces (5 jours après le LFPI) ni de troubles tardifs de la mémoire spatiale (60 jours après le LFPI).

#### 7.1.1.3. Test d'anxiété (Water Exploration Test : WET)

Les résultats obtenus par le WET sont présentés sur les graphes suivants et sont ceux où les différences sont les plus nettes entre les groupes LFPI et Sham. Cependant, ces différences ne s'expriment que précocement jusqu'à J9 post-LFPI. En effet, à partir de J23, il n'existe plus de différence entre les groupes.

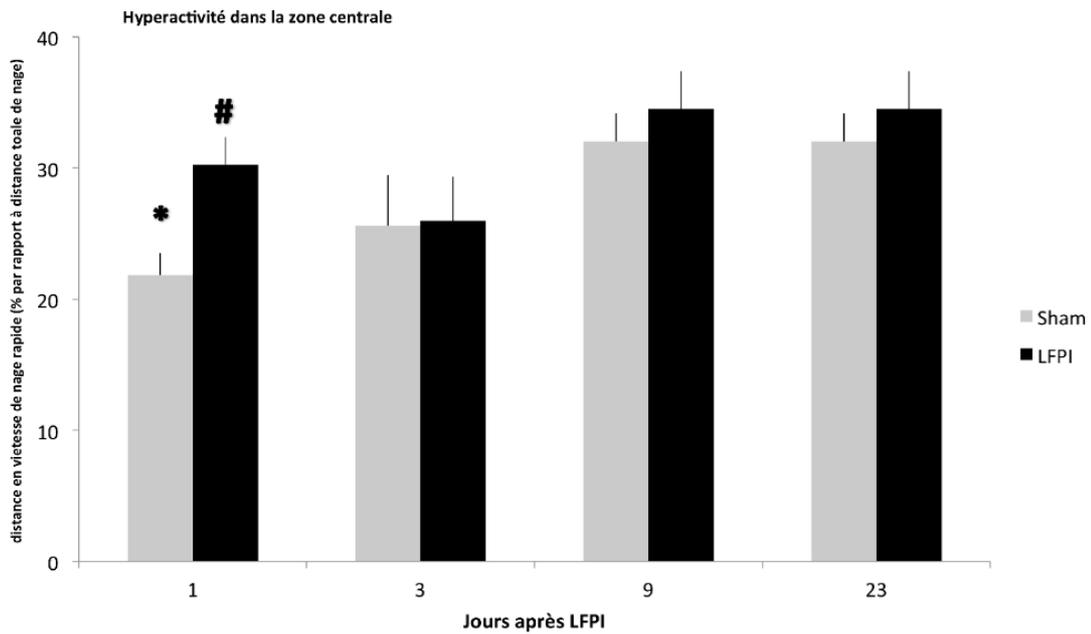


A



B

C



D

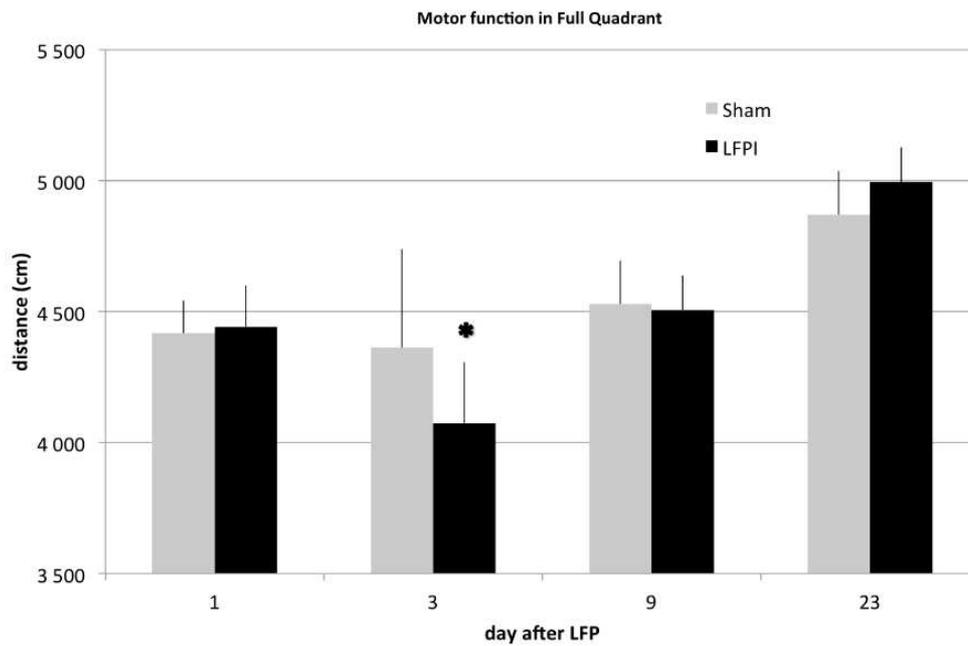


Figure 18 Résultats du WET aux différents temps d'examen après LFPI (moyenne  $\pm$  SEM) ( $n = 11$  par groupe)  
 A : Nombre d'entrées dans la zone centrale ; B : Durée moyenne temps passé dans la zone centrale  
 C : Pourcentage de temps passé en nage rapide par rapport au temps total de nage dans la zone centrale ;  
 D : Distance moyenne totale de nage.

\* :  $p < 0,05$  vs J23 ; # :  $p < 0,05$  vs Sham

Il existe une réduction progressive du nombre d'entrées et de la distance parcourue et du temps passé dans la zone centrale au cours des évaluations successives. Cette différence

disparaît au 23<sup>e</sup> jour. Par ailleurs, au temps précoce J1 post-LFPI, il existe une différence entre les groupes pour le temps passé en vitesse à nage rapide.

L'ensemble du tableau évoque un tableau d'anxiété avec évitement des zones stressantes et accélération de la vitesse de nage dans le passage dans la zone centrale. Une autre hypothèse pourrait être celle d'un tableau de levée de l'inhibition similaire à celle observée dans les syndrome frontaux. Ce tableau anxieux est transitoire puisqu'il disparaît aux temps tardifs de notre expérimentation.

Par ailleurs, il existe également un effet de l'apprentissage de la zone centrale marquée par le fait que les résultats à J23 montrent une augmentation significative de la distance nagée en zone centrale, et du nombre d'entrées en ZC.

## 7.2. Résultats histologiques

### 7.2.1. Préparation du tissu cérébral pour l'histologie, immunomarquages

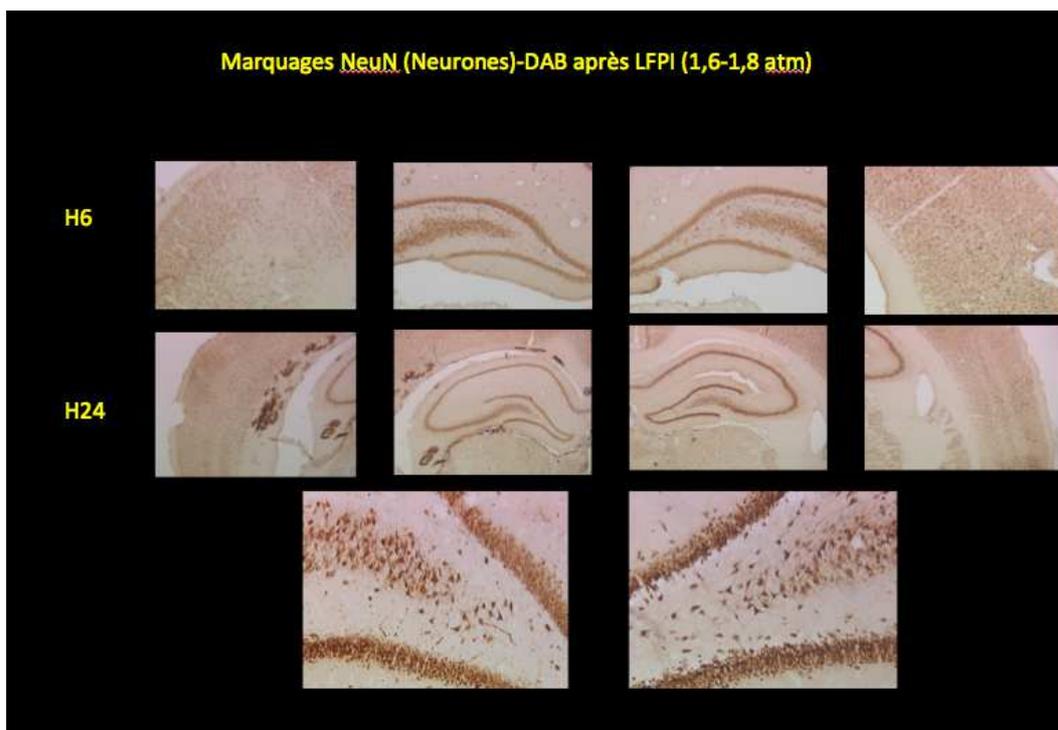
Les données ont été acquises selon les méthodes présentées en annexe 2.

Tant au niveau du cortex pariéto-temporal que du hile du gyrus denté, le nombre de neurones apparaît diminué du côté traumatisé par rapport au côté non traumatisé.

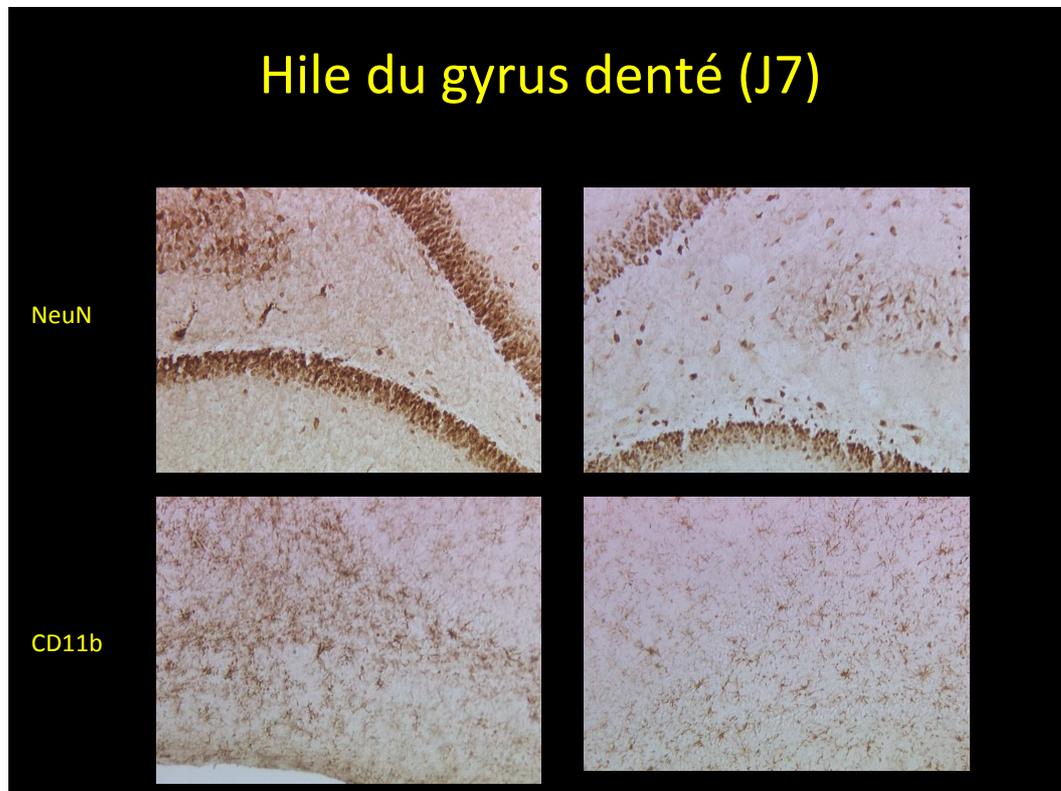
### 7.2.2. Comptes neuronaux

Côté LFPI (Ipsilatéral)

Coté opposé (controlatéral)



A



B

*Figure 19 : Marquages NeuN/DAB (cellules neuronales) et CD11b/DAB (cellules microgliales) sur les cerveaux des mêmes rats après un LFPI de 2 atm. A gauche de l'image, le côté traumatisé, à droite le coté controlatéral au LFPI*

IL existe une perte neuronale précoce, dès la 6<sup>e</sup> heure, qui se maintient à la 24<sup>e</sup> heure.

## Zones de comptages :

HGD : Hile du gyrus denté

CPT : Cortex pariéto-temporal

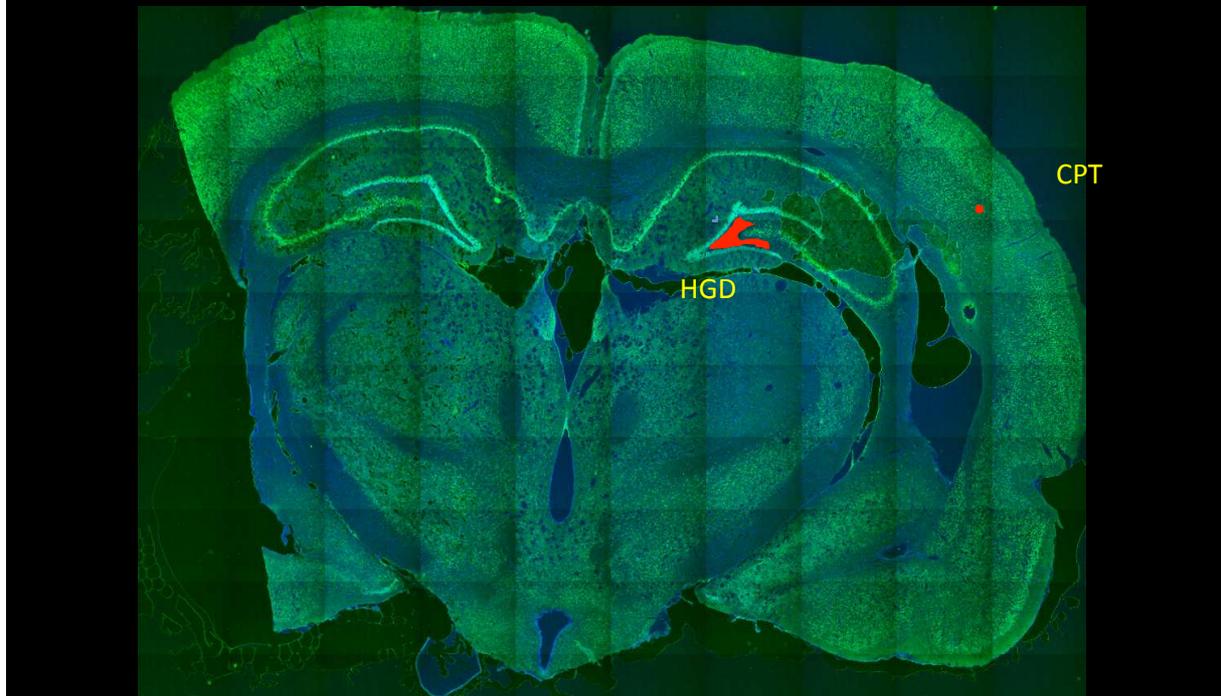


Figure 20 : Coupe histologique du cerveau sur le plan -3,8 mm des planches de Paxinos après coloration NeuN/DAPI. En rouge, sont marqué les zones où les comptes automatiques de cellules ont été réalisés : CPT = cortex pariéto-temporal, HGD= Hile du Gyrus Denté. (A droite de l'image, le côté traumatisé)

Les cellules, identifiées par les colorations immunohistochimiques NeuN<sup>+</sup> et DAPI<sup>+</sup> et comptées automatiquement par l'algorithme informatique dans 2 structures cérébrales que sont le hile du gyrus denté et le cortex pariéto-temporal (tracé des contours sur la figure), sont moins nombreuses du côté traumatisé. Cependant, nous n'avons noté aucune modification de ce compte au niveau du cortex en regard de la zone directement impacté par le LFPI. Ces données sont des données préliminaires et seront complétées très prochainement. Ces résultats préliminaires sont en cours d'extension tant pour ce niveau de traumatisme mais aussi pour des niveaux plus élevés de LFPI (3 et 4 atm).

### 7.2.3. Réponse inflammatoire

#### 7.2.3.1. Histologie

Les immunomarquages ont été réalisés selon les méthodes exposées en annexe 2. Sur le plan de la réponse inflammatoire (voir figure 21), il existe une augmentation progressive et très

importante du marquage cellulaire microglial (CD11b) en regard des zones où l'on observe une disparition des neurones (figure 20). De plus, on observe une très forte augmentation du marquage au niveau du thalamus dorsal sans pour autant qu'il n'y ait de réduction du nombre de neurones. Cette réponse microgliale est plus tardive (J7) mais massive, colonisant le hile du gyrus denté et la partie latérale du cortex pariétal (figure 20 et 21). Il existe aussi de forte zone de marquage d'activation microgliale au niveau du corps calleux. L'aspect du côté controlatéral est très proche de celui observé à H6 après LFPI du côté traumatisé, raison pour laquelle nous n'avons pas présenté les coupes du côté opposé au traumatisme.

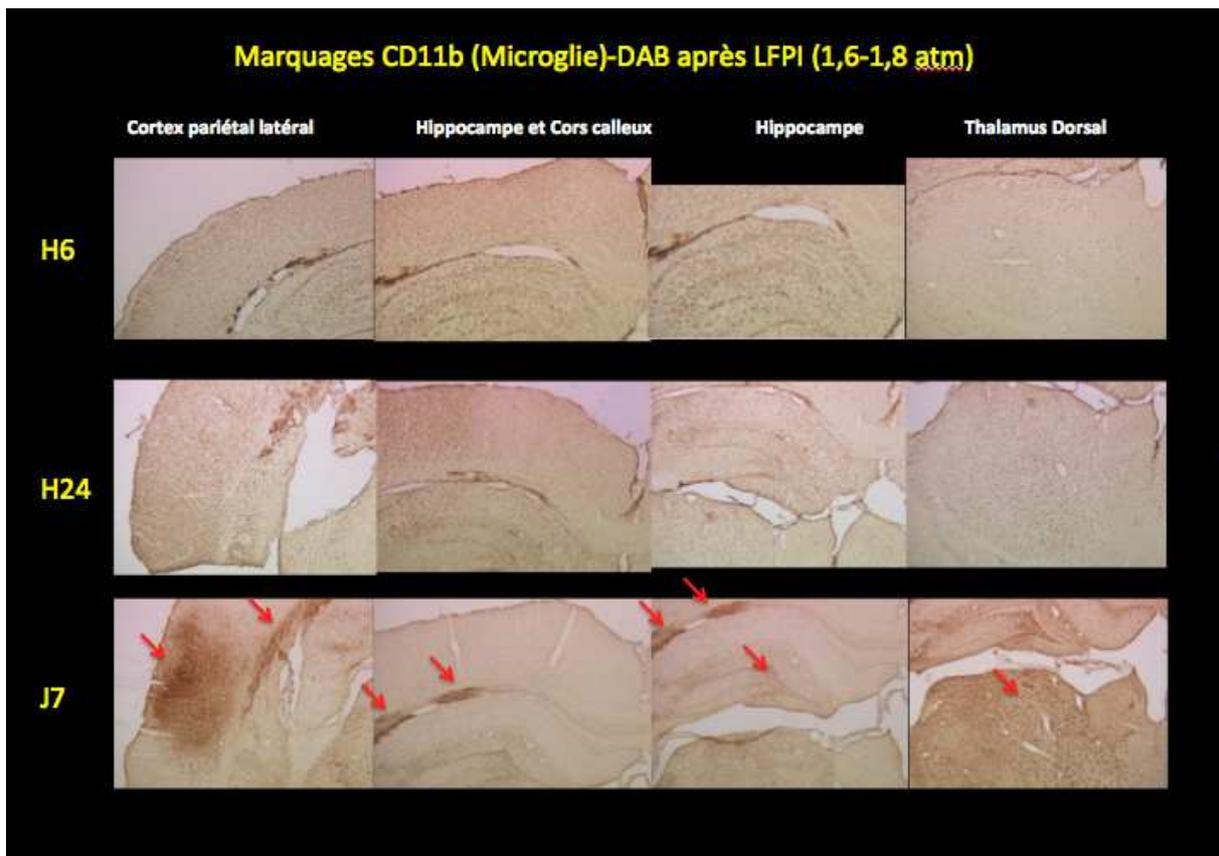


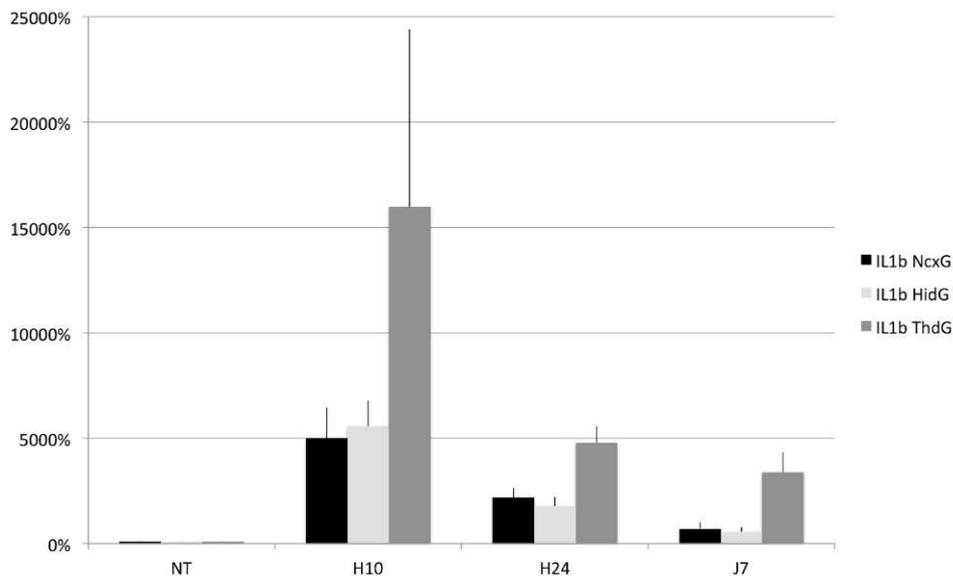
Figure 21 : Suivi (H6, H24 et J7 après LFPI) des marquages CD11b au niveau de l'hémisphère traumatisé au niveau du cortex pariétal latéral, de l'hippocampe et du thalamus dorsal.

Au total, le LFPI induit de la mort neuronale à des sites différents de ceux enregistrés dans d'autres modèles de TC expérimental, en particulier dans le CCI. Les zones où une disparition des neurones est observée précocément sont celles où l'on note les plus fortes réactions microgliales. Enfin, il y a une déconnexion entre la disparition des cellules du hile et la mémorisation spatiale enregistrée par les tests neurocomportementaux, puisque la disparition des premières n'a pas de répercussion sur la seconde. Ce résultat est proche de ceux mis en évidence par Sanders (2000, 2001).

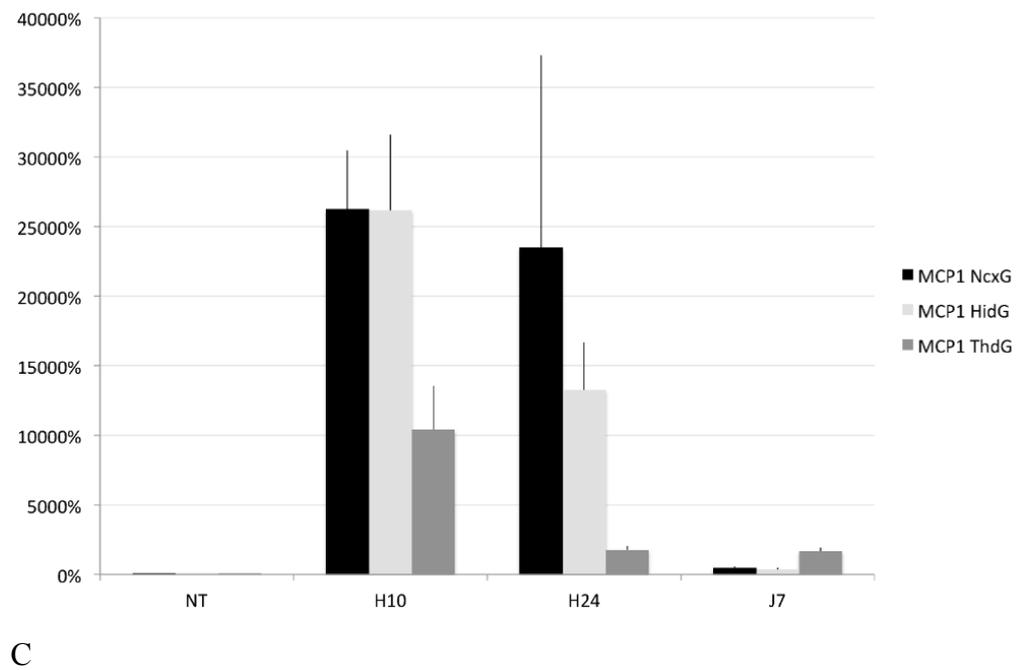
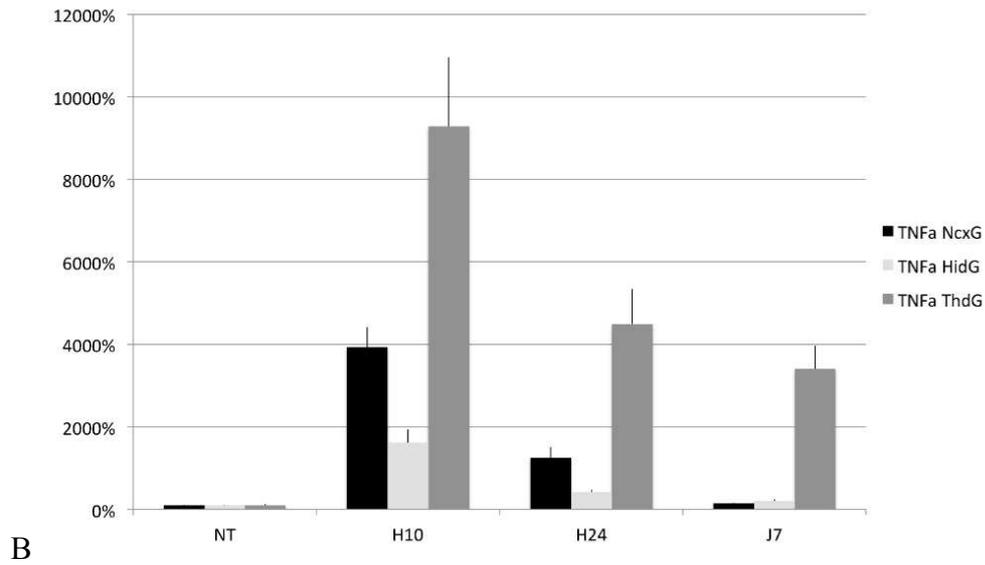
### 7.2.3.2. Réponse en qRT-PCR.

Les données ont été acquises selon les méthodes exposées en annexe 3.

Il n'existe pas de différence de nombre de copies d'ADNc entre les côtés, pour chacune des structures (Néocortex, hippocampe, thalamus) à l'état de base. Par contre, il existe, toujours avant traumatisme, une différence entre les structures cérébrales, dans le nombre de copies d'ADNc, pour toutes les cytokines ou les chimiokines (tableau 13). Toutes les structures du côté du LFPI, augmentent leur nombre de copies d'ADNc des différentes cytokines et chimiokines entre les temps d'études, avec un pic au temps H10, en général de façon explosive (x50 à x150)(figure 22). Le maximum d'augmentation se fait dans le thalamus avec des multiplications atteignant un facteur 150. Ceci est du à l'expression très faible de la réplication ARNm à l'état basal, mais dont la réponse au traumatisme est caractéristique du thalamus. Cette augmentation de l'inflammation est également visible à H10 pour la majorité des cytokines (sauf IL-6) (figure 23) du côté opposé au LFPI, suggérant que cette augmentation du côté droit est plutôt en rapport avec l'événement traumatique.



A



Figures 22 : Variation des nombre de copies (moyenne  $\pm$  SEM) des ARNm de *IL-1 $\beta$*  (A), *TNF $\alpha$*  (B) et *MCP-1* (C) dans les différentes structures analysées du côté traumatisé en fonction du temps après le LFPI.

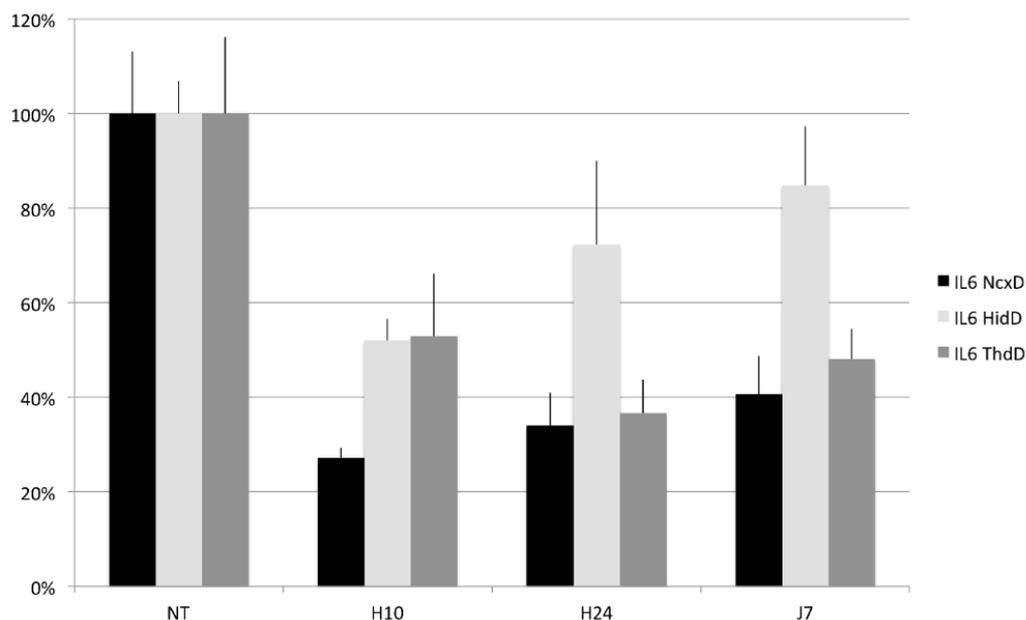


Figure 23 : variation en % (moyenne  $\pm$  SEM) par rapport au groupe NT (Non traumatisé, = Sham ou contrôle) du nombre copies d'ADNc d'IL-6 dans les structures cérébrales opposées (droite) au traumatisme en fonction du temps depuis le LFPI.

Il existe une réponse dans les structures cérébrales controlatérales au traumatisme mais dont l'augmentation n'atteint jamais un facteur 5 soit en moyenne 10 fois moins que du côté traumatisé (voir tableau 13). La réponse IL-6 est très particulière puisque c'est la seule des réponses dites inflammatoires à régresser dans le côté controlatéral au traumatisme, au niveau de l'hippocampe et du néocortex, comparativement à toutes les autres cytokines.

DNA copies (mean±SEM)	Time	Ncx L	Ncx R	HiD L	HiD R	Thd L	Thd R	ANOVA (brain structure)	
<b>Epo</b>	NT	943±141 (x, y)	943±141	400±72	400±72	191±56	191±32	p < 0.001	
	H10	334±44	1159±141	728±268	446±184	639±61	193±37	p = 0.289	
	H24	585±126	1011±208	643±200	445±137	662±93	186±36	p = 0.778	
	D7	1298±327	1082±170	735±159	386±109	917±155 (f)	331±31	p = 0.037	
	<b>ANOVA</b>	<b>p = 0.013</b>	<b>p = 0.669</b>	<b>p = 0.554</b>	<b>p = 0.935</b>	<b>p = 0.001</b>	<b>p = 0.036</b>		
	<i>Epo (%)</i>	<i>NT</i>	<i>100±15</i>	<i>100±11</i>	<i>100±18</i>	<i>100±17</i>	<i>100±29</i>	<i>100±14</i>	
	<i>H10</i>	<i>35±5</i>	<i>123±11</i>	<i>182±67</i>	<i>116±19</i>	<i>335±31</i>	<i>101±13</i>		
	<i>H24</i>	<i>62±13</i>	<i>107±22</i>	<i>161±50</i>	<i>111±19</i>	<i>347±49</i>	<i>98±7</i>		
	<i>D7</i>	<i>138±34</i>	<i>115±18</i>	<i>184±40</i>	<i>97±16</i>	<i>480±81</i>	<i>173±32</i>		
	<b>EpoR</b>	NT	880±59 (x, y)	880±34 (y)	292±19 (y)	292±19 (y)	45±16	45±3	p < 0.001
H10		1193±94 (T, x, y)	938±58 (x)	409±32	332±24	617±27 (a, b, c, t)	48±5	p < 0.001	
H24		1148±149 (T, x, y)	916±83	288±32	267±13	442±16 (d)	50±4	p < 0.001	
J7		1478±259 (T, x, y)	971±80	490±47 (e, f)	403±6	347±36 (f)	63±6	p < 0.001	
<b>ANOVA</b>		<b>p = 0.115</b>	<b>p = 0.819</b>	<b>p &lt; 0.001</b>	<b>p &lt; 0.001</b>	<b>p &lt; 0.001</b>	<b>p = 0.033</b>		
<i>EpoR (%)</i>		<i>NT</i>	<i>100±7</i>	<i>100±4</i>	<i>100±7</i>	<i>100±5</i>	<i>100±36</i>	<i>100±6</i>	
<i>H10</i>		<i>136±11</i>	<i>107±7</i>	<i>140±11</i>	<i>114±8</i>	<i>137±60</i>	<i>108±10</i>		
<i>H24</i>		<i>130±17</i>	<i>104±9</i>	<i>99±11</i>	<i>92±4</i>	<i>98±36</i>	<i>110±8</i>		
<i>J7</i>		<i>168±29</i>	<i>110±9</i>	<i>168±16</i>	<i>138±2</i>	<i>77±80</i>	<i>140±14</i>		
<b>IL-1b</b>		NT	6982±511 (y)	6982±377 (y)	3861±508	4044±1371	241±40	241±190	p < 0.001
	H10	34800±101647 (a, T, y)	19745±5122	215461±46145 (a, b, c)	29297±10382	38505±20283	2779±1368	p < 0.001	
	H24	152738±30971 (T, x, y)	12508±1990	68541±16929	11927±1581	11547±1842	1021±62	p < 0.001	
	J7	49322±20688	11628±4108	5825±8209	5885±1669	8136±2299	877±197	p = 0.015	
	<b>ANOVA</b>	<b>p = 0.004</b>	<b>p = 0.081</b>	<b>p &lt; 0.001</b>	<b>p = 0.026</b>	<b>p = 0.128</b>	<b>p = 0.122</b>		
	<i>IL-1b (%)</i>	<i>NT</i>	<i>100±7</i>	<i>100±5</i>	<i>100±13</i>	<i>100±34</i>	<i>100±17</i>	<i>100±79</i>	
	<i>H10</i>	<i>498±1456</i>	<i>283±73</i>	<i>5580±1195</i>	<i>759±269</i>	<i>15977±8416</i>	<i>1153±568</i>		
	<i>H24</i>	<i>2188±444</i>	<i>179±28</i>	<i>1775±438</i>	<i>309±41</i>	<i>4791±764</i>	<i>424±26</i>		
	<i>J7</i>	<i>706±296</i>	<i>167±59</i>	<i>558±213</i>	<i>152±43</i>	<i>3376±954</i>	<i>364±82</i>		
	<b>TNFa</b>	NT	1400±152 (y)	1400±222 (y)	666±76	1439±265	24±9	24±1	p < 0.001
H10		55003±6932 (a, b, c, T, x, y)	2647±817	10794±2086 (a, b, c)	1805±585	2183±393 (a, c)	43±15	p < 0.001	
H24		17540±3598 (T, x, y)	1315±58	2777±400	958±199	1056±199	17±3	p < 0.001	
J7		2116±233	791±146	1355±262	1213±190	799±132	32±5	p < 0.001	
<b>ANOVA</b>		<b>p &lt; 0.001</b>	<b>p = 0.034</b>	<b>p &lt; 0.001</b>	<b>p = 0.100</b>	<b>p &lt; 0.001</b>	<b>p = 0.146</b>		
<i>TNFa (%)</i>		<i>NT</i>	<i>100±11</i>	<i>100±10</i>	<i>100±11</i>	<i>100±18</i>	<i>100±38</i>	<i>100±3</i>	
<i>H10</i>		<i>3929±495</i>	<i>189±58</i>	<i>1621±313</i>	<i>271±88</i>	<i>9100±1638</i>	<i>179±61</i>		
<i>H24</i>		<i>1253±257</i>	<i>94±4</i>	<i>417±60</i>	<i>144±44</i>	<i>4400±829</i>	<i>71±10</i>		
<i>J7</i>		<i>151±17</i>	<i>57±10</i>	<i>203±39</i>	<i>182±28</i>	<i>3329±550</i>	<i>135±21</i>		
<b>MCP-1</b>		NT	15480±960 (y)	15480±960 (y)	19642±2130 (y)	17879±2078	3907±404 (t)	3907±300	p < 0.001
	H10	4064034±653312 (T, y)	90745±21072 (a,b,c)	5142405±1067790 (a, b, c, T, y)	209378±49590	406805±122770 (a)	16545±4941	p < 0.001	
	H24	3635704±2141940	2638±3755	2603542±668067	121543±898004	68737±10935	4347±1467	p = 0.027	
	J7	73746±18239	22584±8565	71872±19470	33709±2306	65134±10091	7515±836	p = 0.062	
	<b>ANOVA</b>	<b>p = 0.013</b>	<b>p &lt; 0.001</b>	<b>p &lt; 0.001</b>	<b>p = 0.191</b>	<b>p &lt; 0.001</b>	<b>p = 0.032</b>		
	<i>MCP-1 (%)</i>	<i>NT</i>	<i>100±6</i>	<i>100±5</i>	<i>100±11</i>	<i>100±12</i>	<i>100±10</i>	<i>100±8</i>	
	<i>H10</i>	<i>26253±4220</i>	<i>586±136</i>	<i>26181±5436</i>	<i>1066±252</i>	<i>10412±3142</i>	<i>423±126</i>		
	<i>H24</i>	<i>23486±13837</i>	<i>170±24</i>	<i>13255±3401</i>	<i>4572±1759</i>	<i>1759±280</i>	<i>111±38</i>		
	<i>J7</i>	<i>476±270</i>	<i>146±55</i>	<i>366±99</i>	<i>172±12</i>	<i>1667±258</i>	<i>192±21</i>		
	<b>IL-6</b>	NT	55±7 (y)	55±15 (x, y)	23±3	23±3	1±1	-	p < 0.001
H10		222±69 (T, x, y)	14±1 (a)	43±6 (a, b, c)	11±1	37±13	-	p < 0.001	
H24		112±42 (x, y)	18±4 (d)	14±2	16±4	11±4	-	p = 0.001	
J7		36±5	22±4 (f)	18±2	19±3	4±1	-	p < 0.001	
<b>ANOVA</b>		<b>p = 0.032</b>	<b>p &lt; 0.001</b>	<b>p &lt; 0.001</b>	<b>p = 0.063</b>	<b>p = 0.012</b>	-		
<i>IL-6 (%)</i>		<i>NT</i>	<i>100±13</i>	<i>100±13</i>	<i>100±13</i>	<i>100±7</i>	-	-	
<i>H10</i>		<i>404±125</i>	<i>27±2</i>	<i>187±26</i>	<i>51±4</i>	-	-		
<i>H24</i>		<i>204±76</i>	<i>34±7</i>	<i>61±9</i>	<i>71±18</i>	-	-		
<i>J7</i>		<i>65±9</i>	<i>41±8</i>	<i>78±9</i>	<i>84±13</i>	-	-		

Test bonferonni : p < 0.0125;

Test bonferonni : p < 0.007

a: between H10 and NT,  
b: between H10 and H24  
c: between H10 and Day7  
d: between H24 and NT\$  
e: between H24 and Day7  
f: between Day7 and NT

T: vs non trauma  
x: vs Hippocampus ipsilateral  
y: vs Thalamus ipsilateral

Tableau 13 : Réponses géniques des différentes cytokines ou chimiokines en nombre de copies et en pourcentage de variation (%) en fonction des structures et des temps d'études. (L = Left ; R : Right, Ncx : Néocortex, HiD : Hippocampe dorsal, ThD : Thalamus dorsal).

### 7.2.4. Réponse du système Epoergique

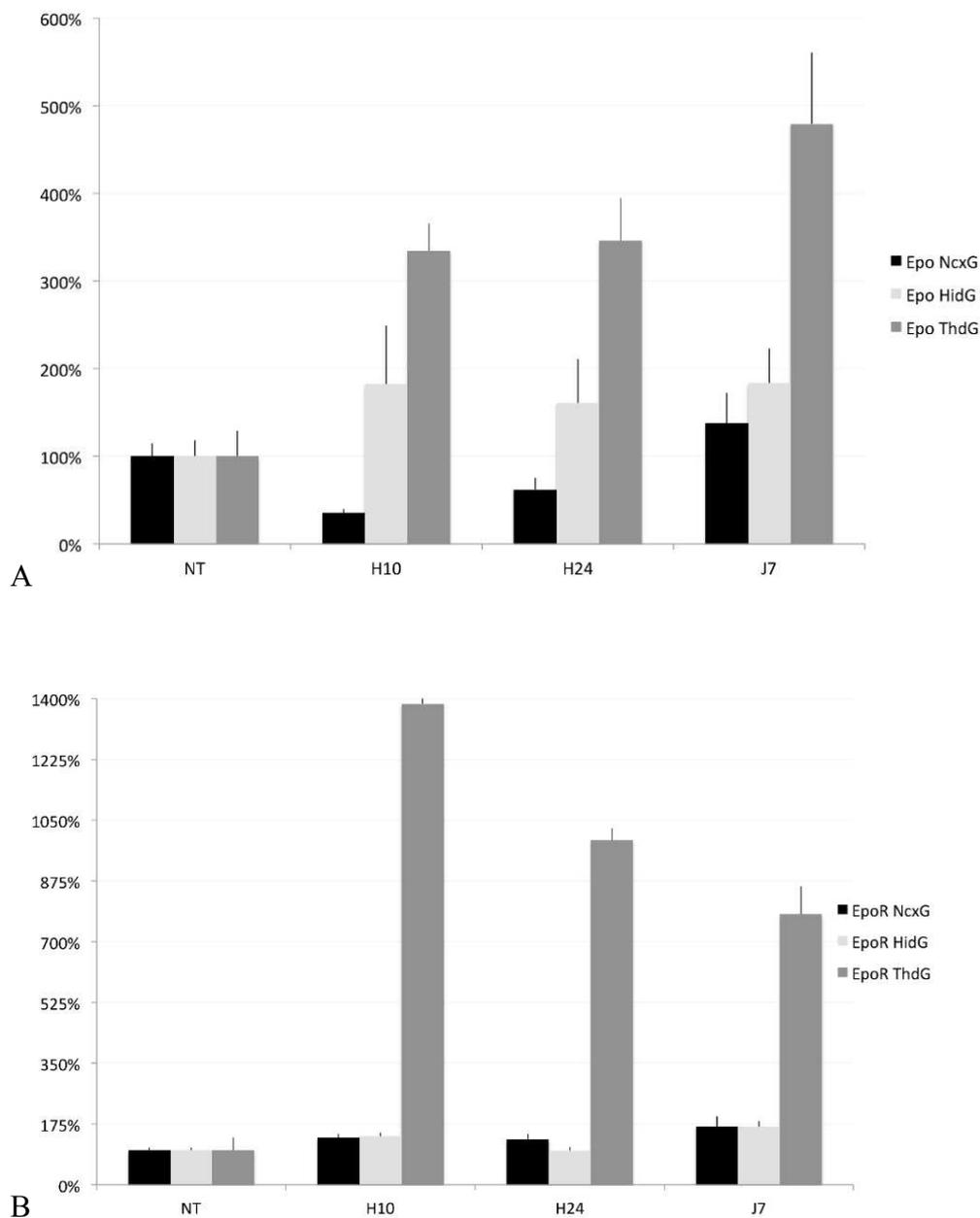


Figure 24 : réponses géniques du système Epoergique des différentes structures cérébrales après LFPI 1,6-1,8 atm. A : réponse Epo. B : Réponse EpoR

A l'état de base, les nombres d'ADNc des gènes de l'Epo ou de l'EpoR sont différents entre les structures cérébrales mais pas entre les côtés. En particulier, elles sont les moins nombreuses pour ces deux gènes cibles dans le thalamus (tableau 13). Après LFPI, on observe une diminution de la réponse génique Epo au niveau du cortex (figure 24 A) qui revient au niveau de base à la 24<sup>e</sup> heure. Il existe une augmentation progressive de cette réponse pour les

autres structures cérébrales. A l'opposé, après LFPI, c'est bien dans le thalamus qu'on observe la plus forte ascension du nombre de copies des ARNm de l'Epo et de l'EpoR. Dans toutes les autres structures, on observe une augmentation progressive du nombre de copies des ARNm de l'Epo (Figure 24).

Le nombre de copies d'EpoR augmente significativement dès H10 dans toutes les structures. L'augmentation de la réponse génique Epoergique est plus tardive du côté opposé au LFPI comme du côté traumatisé comparativement à la réponse inflammatoire. Cette augmentation tardive suppose une adaptation globale de l'encéphale à une pathologie qu'on peut qualifiée de régionale et même générale.

### 7.2.5. Réponse IRM-DTI

La méthodologie des séquences d'acquisition de l'IRM est présentée en annexe 4

A

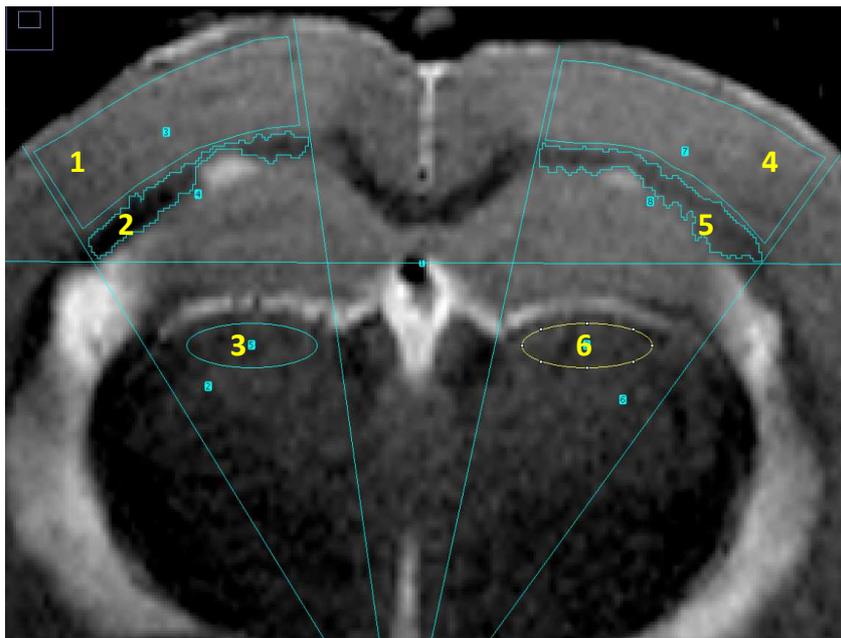
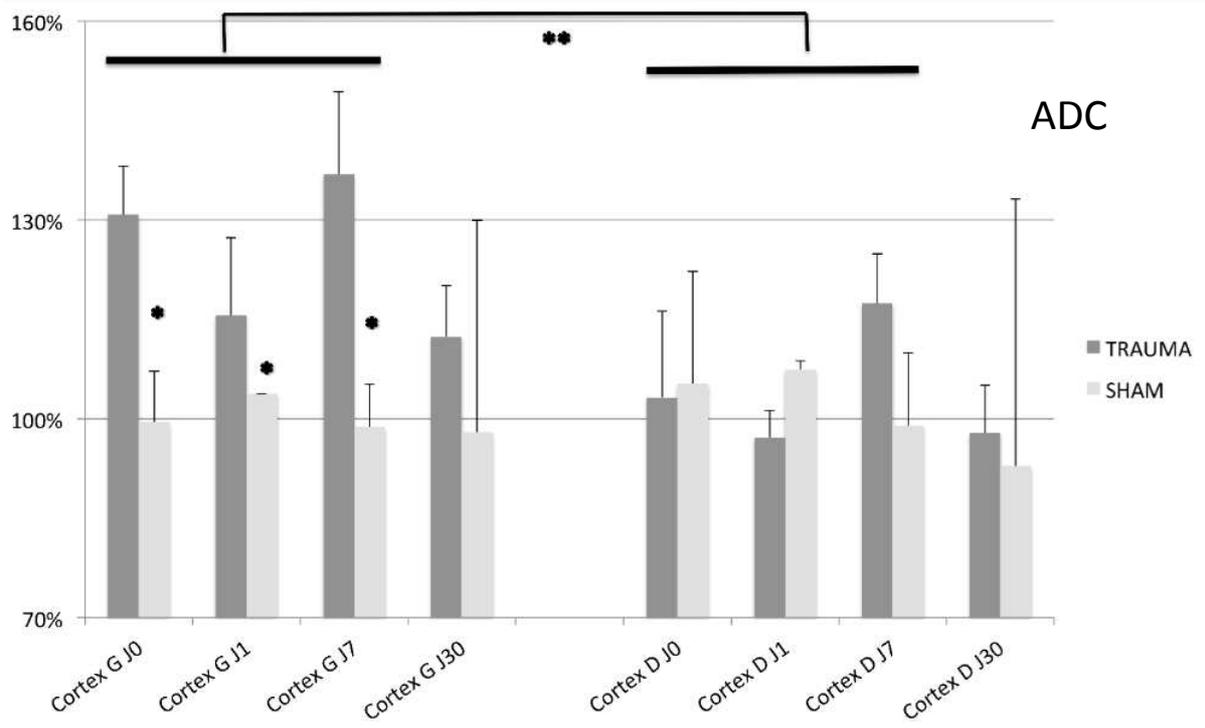
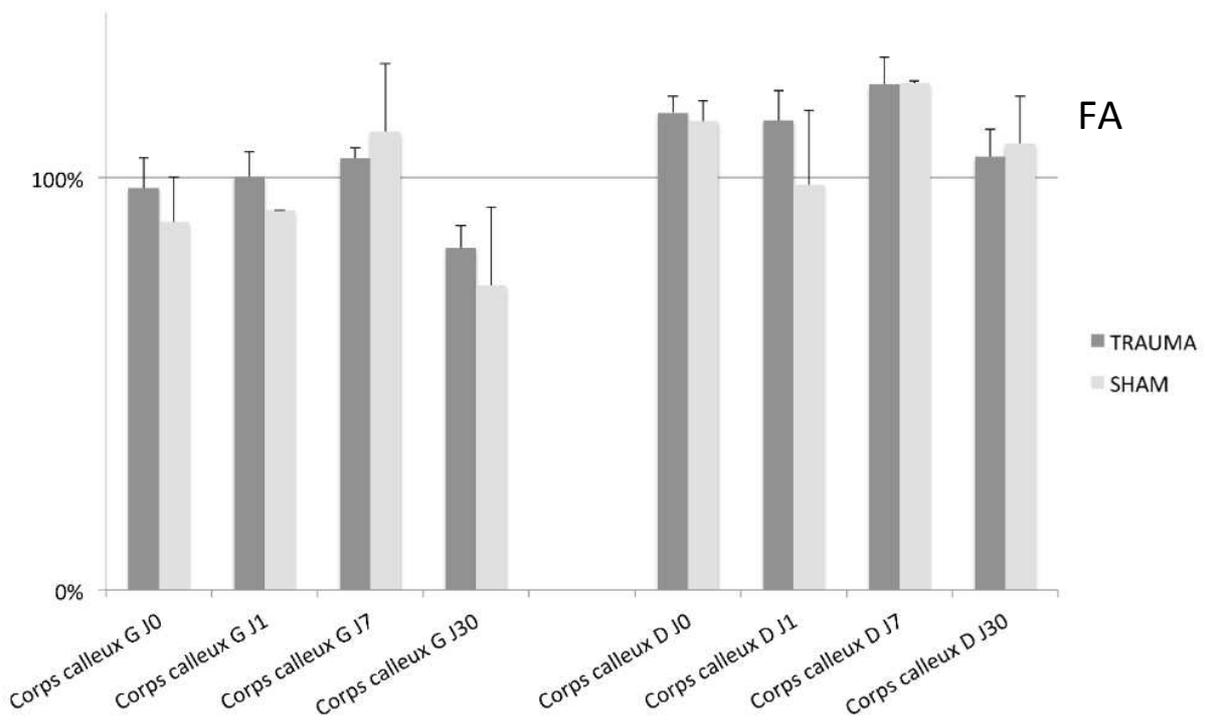


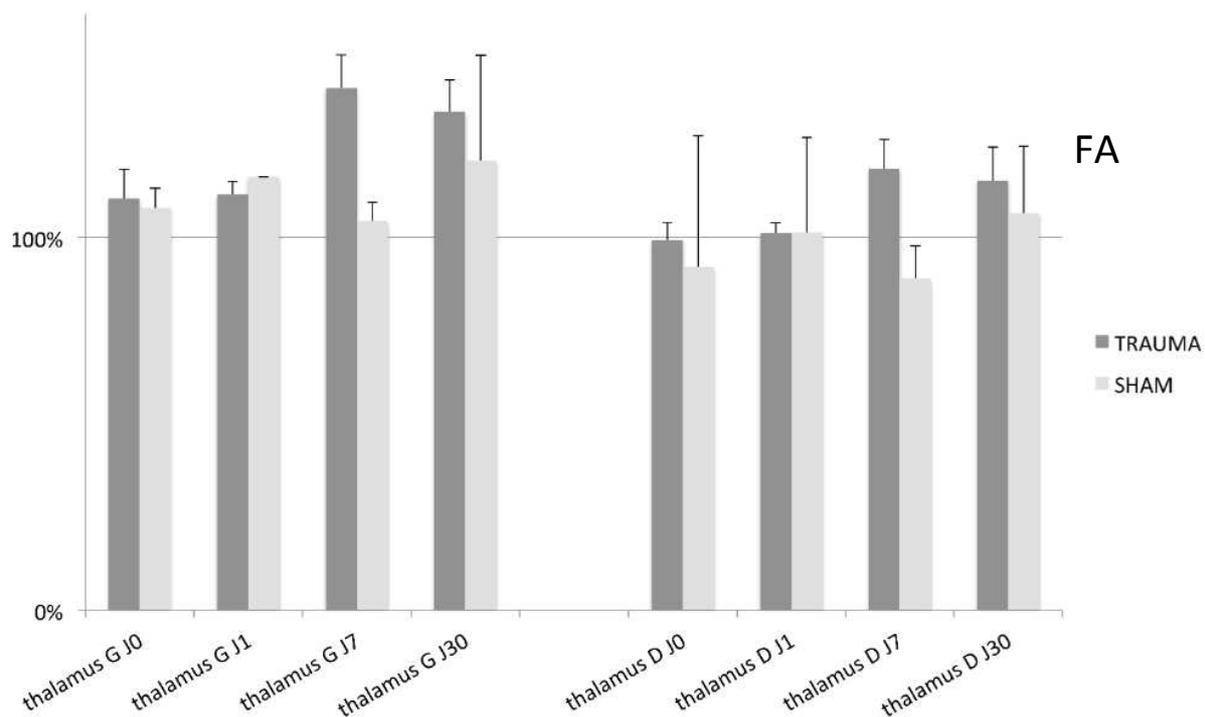
Figure 25 : Images en T2 dessinée sous imageJ délimitant les régions d'intérêt analysées symétriques entre les côtés : Du côté du traumatisme : 1 : cortex, 2 : corps calleux, 3 : thalamus. Du côté opposé au traumatisme : 4 : cortex, 5 : corps calleux, 6 thalamus. Les régions d'intérêt ont toutes une taille minimum de 100 pixels. Les paramètres sont analysés sur la moyenne des signaux acquis par région d'intérêt.



A



B



C

Figure 26 : A : Coefficient apparent de diffusion de l'eau (ADC) du cortex cérébrale selon les délais depuis le LFPI. L'expression est faite en pourcentage par rapport aux cortex gauche et droit des témoins non traumatisés. Fraction d'anisotropie (FA) des différentes structures cérébrales selon les délais depuis le LFPI exprimée en pourcentage de la valeur de base des structures G et D. A : cortex ; B : Corps calleux ; C : thalamus. \* :  $p < 0,05$  entre les groupes LFPI et sham; \*\*  $< 0,05$  entre les côtés traumatisés et non traumatisés des rats LFPI.

Les variations de l'ADC au niveau du cortex sont significatives et précoces entre les côtés ipsi et controlatéral au LFPI. Ces différences s'estompent avec le temps car à J30 on ne retrouve plus de différence entre les côtés ou entre les animaux traumatisés ou non traumatisés. Par contre, au niveau du corps calleux tout comme au niveau du thalamus, nous n'avons pas retrouvé de différence de FA ou d'ADC à aucun des temps d'analyse, entre les structures, ou entre les groupes LFPI (trauma) ou Sham.

On constate que les éléments fournis par l'IRM sont significatifs au niveau cortical mais ne mesurent aucun effet du LFPI de 1,6-1,8 atm au niveau du corps calleux et du thalamus chez l'animal.

Conclusion de l'étude 3 :

Gardant à l'esprit que les conséquences fonctionnelles (ou comportementales) étant les garantes de l'efficacité d'un traitement neuroprotecteur, il nous fallait d'abord actualiser, les connaissances sur les troubles neurocomportementaux, les conséquences IRM-DTI, plus sensibles que les imageries conventionnelles, et confirmer les lésions histologiques et en

biologie moléculaire pour un niveau de lésion donnée dans le modèle expérimental de TC par LFPI. L'ensemble des données à notre disposition après ce programme de recherche permet de conclure que les événements mis en jeu lors d'un LFPI de 1,6-1,8 atm, signent un Traumatisme crânien mineur car sans conséquences cliniques prolongées et sans lésions des structures de la substances blanches en IRM-DTI. Par contre, ce TC engendre une réponse inflammatoire massive et prolongée mise en évidence tant par la réponse inflammatoire tant génique qu'histologique mais également Eporgique.

### ***7.3. Effets de l'Epo-rh sur la réponse inflammatoire génique et protéique après LFPI (Etude 3 et 4)***

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre de cette thèse, l'Epo-rh a des effets sur la réponse inflammatoire après agression cérébrale.

Nous avons donc étudié la variation des réponses géniques des différents protéines de l'inflammation dont nous avons montré que leur réponse après LFPI était explosive à la 10<sup>e</sup> heure. L'Epor-rh a été injectée par voie intra-péritonéale immédiatement après le LFPI à la dose de 5000 UI/kg (volume de 0,6 ml environ d'une solution d'Epo concentrée à 2500 UI/kg). Les rats étaient ensuite sacrifiés à H10 et les procédures des qRT-PCR étaient réalisés de façon similaires à la précédente expérience. Nous n'avons pas enregistré de modifications du nombre de copies des gènes cibles d'aucune des protéines inflammatoire parès l'administration d'Epo-rh. Nous ne présentons que les résultats

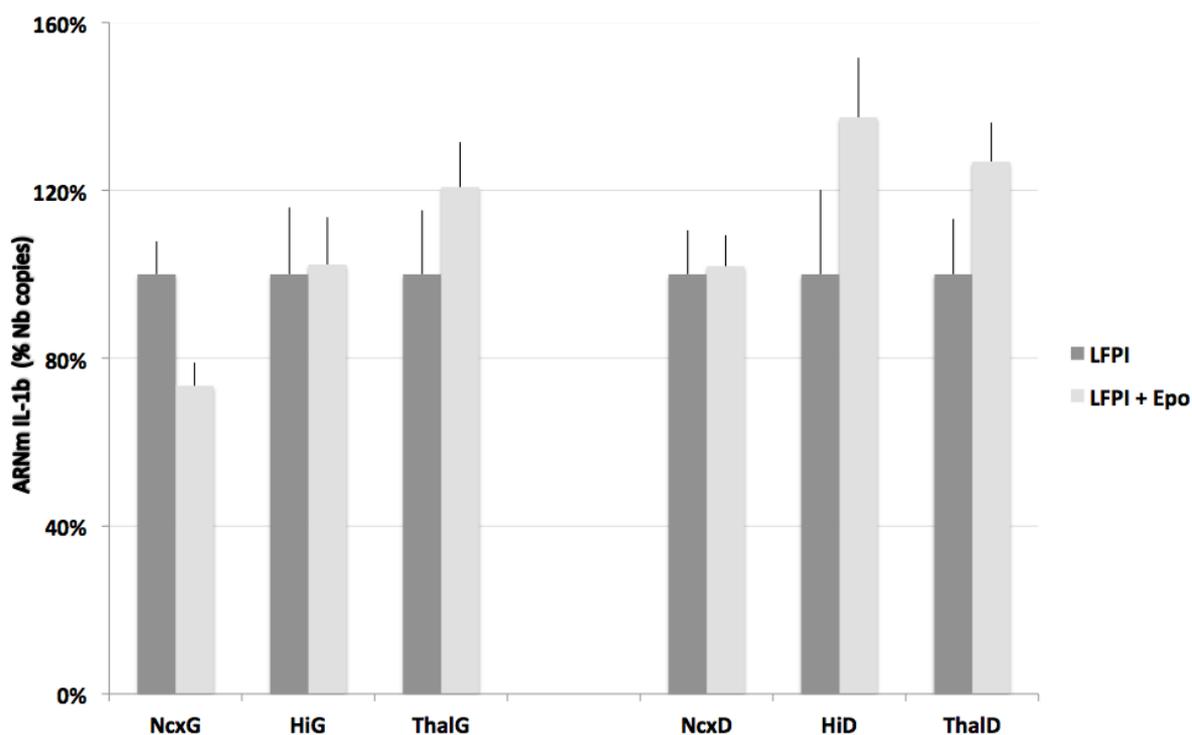


Figure 27 : Modulation de la réponse génique IL-1 $\beta$  à la 10<sup>e</sup> heure après LFPI sans et avec Epo-rh (5000 UI/kg ip). Les résultats sont présentés en ratio par rapport aux valeurs du groupe LFPI (n = 4 par groupe).

Les gènes analysés ont été les mêmes que ceux identifiés dans la partie précédente (IL-1  $\beta$ , TNF $\alpha$ , MCP-1 et IL-6. Nous n'avons pas mis en évidence de modulation de l'explosion de la réponse génique dans aucune des structures cérébrales (figure 27).

Les effets potentiels de l'Epo-rh pouvant ne pas être visibles sur les gènes mais sur les protéines circulantes, nous avons donc testé les effets de l'Epo-rh sur 2 cytokines pro-inflammatoires mais avec des cibles différentes, l'une, IL-1 $\beta$ , initiatrice de très nombreuses cascades inflammatoires, l'autre, MIP-2, plus spécialisée dans la diapédèse polymorphonucléaire. Nous avons montré que l'Epo-rh écrivait significativement le pic de concentrations situé à la 8<sup>e</sup> heure pour la protéine IL-1 $\beta$  dans le cerveau du côté lésé, et réduisait les concentrations de MIP-2 au temps tardifs après TC-LFPI. Nous montrons que l'Epo-rh réduit les concentrations corticales des protéines IL-1  $\beta$  et de MIP-2 (Etude 4, Lieutaud 2008).

Parallèlement, comme nous ne retrouvons d'effets ni sur la protéine IL-1 $\beta$  à la 4<sup>e</sup> heure, ni sur la réponse génique à la 10<sup>e</sup> heure, nous avons étudié la pharmacocinétique de l'Epo-rh dans le parenchyme cortical, i) en comparant les concentrations d'Epo-rh à la 4<sup>e</sup> heure après injection intra-péritonéale ou intraveineuse et après différentes posologies, et ii) en suivant la décroissance des concentrations d'Epo-rh pendant les 24 premières heures après l'injection. A la 4<sup>e</sup> heure après l'injection (et donc après le LFPI), les concentrations corticales d'Epo-rh obtenus dans les côtés traumatisés sont non significativement différentes quelle que soit la

voie d'administration envisagée (intrapéritonéale ou intraveineuse), alors qu'elles sont légèrement supérieures du côté non traumatisé pour la voie intrapéritonéale. Ces concentrations sont bien supérieures dans le cortex traumatisé par rapport au côté non traumatisé, évoquant une rupture de la BHE soit physique, soit lié au pic d'hypertension artérielle classiquement retrouvé après LFPI (McIntosh 1989). Enfin, Les pentes de l'évolution des concentrations d'Epo-rh offrent une décroissance log-linéaire avec des pentes différentes entre les côtés traumatisés et non traumatisés. A la 24<sup>e</sup> heure après l'injection intrapéritonéale, les concentrations d'Epo-rh restent significative élevées du côté traumatisé alors qu'elles deviennent indétectables du côté opposé à la lésion.

Conclusion des études 3 et 4 :

Ces résultats suggèrent au moins trois pistes d'explication différentes :

- a- l'Epo-rh, pour ce qui est de la réponse inflammatoire, n'agirait pas au niveau du parenchyme cérébral mais au niveau du transfert des molécules apportées de l'extérieur par des cellules médiatrices de l'inflammation vers le tissu cérébral. On peut donc suspecter essentiellement les macrophages circulants d'être ces porteurs d'inflammation, mais les cellules endothéliales pourraient également être de très bons candidats à des effets de l'Epo-rh par le renforcement de leur capacité à contenir les messages inflammatoires à l'extérieur du parenchyme cérébral. L'Epo-rh agirait ainsi, non pas seulement comme facteur de protection cérébrale mais comme un régulateur de la réponse périphérique à une agression cérébrale, dans un rôle neuroprotecteur indirect ;
- b- l'Epo-rh pourrait agir sur la disponibilité immédiate des stocks de médiateurs de l'inflammation, stocks qui seraient quiescents dans le cerveau et non accessibles à la mesure par ELISA en condition basale. Ce stockage, masquant les antigènes classiquement utilisés se ferait sous une forme de « pro-protéine » ou d'un couplage « protéine-inhibiteur ». A l'occasion d'un stress, ce stock serait libéré à partir des cellules microgliales, astrocytaires ou monocytaires et apparaîtrait dans sa forme mesurable. L'Epo-rh jouerait donc sur la stabilité ou labilité de ces stocks de protéines et serait donc bien dans un rôle de neuroprotecteur direct. Dans cette deuxième hypothèse, le franchissement de la barrière hémoméningée par l'Epo-rh est crucial.
- c- Enfin les délais choisis pour mesurer la réponse génique inflammatoire après Epo-rh pourraient avoir été trop tardifs. Malgré des augmentations des nombres de copies des ARNm largement supérieures à celles observées avec les concentrations de protéines,

nous envisageons de vérifier que l'Epo-rh ne modifie pas, après LFPI, les réponses géniques à un point plus précoce que le point à H10 que nous avons choisi dans les travaux présentés ici

- d- Enfin la caractéristique pro-inflammatoire souvent attribuée à l'IL-6 doit être questionnée

# Characterization of the Pharmacokinetics of Human Recombinant Erythropoietin in Blood and Brain When Administered Immediately after Lateral Fluid Percussion Brain Injury and Its Pharmacodynamic Effects on IL-1 $\beta$ and MIP-2 in Rats

Thomas Lieutaud,<sup>1</sup> Peter J.D. Andrews,<sup>2</sup> Jonathan K.J. Rhodes,<sup>2</sup> and Robert Williamson<sup>2</sup>

## Abstract

This study sought to determine the bio-availability of recombinant human erythropoietin (EPO) in the brain and blood and its effects on the cerebral concentrations of the inflammatory mediators interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and macrophage-inflammation protein-2 (MIP-2) following lateral fluid percussion brain injury (FPI) in the rat. After induction of moderate FPI (1.6–1.8 atm), EPO was injected intraperitoneally (IP) or intravenously (IV) at doses of 1000–5000 U/kg in a randomized and blinded manner. Animals were then sacrificed at time points (4, 8, 12, 24 h) post-trauma, and the brain concentrations of EPO, IL-1 $\beta$ , and MIP-2 were determined. EPO administration leads to a dose-dependent increase in the brain concentration of the drug; however, this could only be detected at doses of 3000 and 5000 U/kg. The cerebral concentration peaked in the first 4 h following trauma. EPO concentrations were significantly higher and decreased more slowly in the traumatized cortex compared to the contralateral side ( $p < 0.0125$ ). IV EPO (5000 U/kg) produced slightly higher concentrations of EPO than same doses injected IP; however, this was not significant. At a dose of 5000 U/kg, EPO significantly reduced the increase in IL-1 $\beta$  at 8 and 12 h in both cortical sides. It also reduced the increase in MIP-2 but only after 8 h, on the contralateral side and after 12 h on the ipsilateral side. Our results suggest that EPO crosses the blood-brain barrier (BBB) by 4 h after trauma and is localized primarily in the traumatized cortex. Further, it has biological efficacy at 8 h on several inflammatory proteins, yet must be employed at high doses to cross the BBB.

**Key words:** erythropoietin; fluid percussion injury; interleukin-1 $\beta$ ; macrophage inflammatory protein-2

## Introduction

**T**RAUMATIC BRAIN INJURY (TBI) induces an early inflammatory response with increased concentrations of cerebrospinal fluid (CSF) cytokines (Csuka et al., 1999; Hayakata et al., 2004; McClain et al., 1987; Ross et al., 1994) and cortical inflammatory mediators, including interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Kamm et al., 2006; Taupin et al., 1993c; Zhu et al., 2004) and macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) (Otto et al., 2001; Valles et al., 2006). The inflammatory response, with blood-brain barrier (BBB) dysfunction and leucocyte recruitment, represents a significant secondary insult with associated neuronal loss and cognitive, behavioral, and neuropsychological impairment (Marshall, 2000). These events occur

hours to weeks following brain trauma offering the possibility of several pharmacological approaches to beneficial modulation of these process after injury.

Recombinant human erythropoietin (EPO) shows potential in neuroprotection with a wide range of effects on inflammation (Gorio et al., 2005), apoptosis (Lee et al., 2006), and neurogenesis (Lu et al., 2005) in different animal models of brain and spinal cord injury. It has also proved to be beneficial in small clinical studies in stroke patients (Ehrenreich et al., 2002), schizophrenia (Ehrenreich et al., 2004), and multiple sclerosis patients (Ehrenreich et al., 2007). In animal models of TBI, EPO has proven efficacy on apoptosis pathways, improving lesion volume (Brines et al., 2000a), inflammation (Lu et al., 2005a,b), and functional recovery (Yat-

<sup>1</sup>Department Reanimation et Anesthesiologie, Hôpital Neurologique, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

<sup>2</sup>Department of Anaesthesia, Critical Care and Pain Medicine, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom.

siv et al., 2005; Siren, 2006). Moreover, EPO reduces brain water content whether measured by magnetic resonance imaging (MRI) 5 h following closed head injury (Verdonck et al., 2007) or after cryogenic injury (Grasso et al., 2007) and decreases the BBB disruption (Grasso et al., 2007).

Although some of the anti-inflammatory properties of EPO have been studied in several models, including cell cultures (Villa et al., 2003), spinal cord trauma (Gorio et al., 2005), focal TBI (Ozsisik et al., 2007; Yatsiv et al., 2005), diffuse TBI (Verdonck et al., 2007), and neonatal ischemia (Kumral et al., 2004), its mechanism of neuroprotection as well as its pharmacokinetic and pharmacodynamic properties are poorly understood. Using radiolabelled drug, Brines et al. (2000) were able to identify EPO in the brain 5 h after intraperitoneal (IP) administration, demonstrating that it crossed the BBB despite its hydrophilic properties. Nadam et al. (2007) described the brain uptake of EPO injected before or after status epilepticus induced by pilocarpine in rats and demonstrated that the pilocarpine-induced BBB disruption enhanced the EPO access into the brain. Xenocostas et al. (2005) described the pharmacokinetics of EPO in CSF and blood in four patients with cancer using an Omayo reservoir and showed a lag time of 3 h to find EPO in CSF which peaked between 9 and 24 h after a single dose of 1500 U/kg. Up to now, there has been no published data on EPO kinetics early after brain trauma either in rodents or in humans.

The aim of this study was to describe the pharmacokinetics of EPO in a moderate lateral fluid percussion injury (FPI) model and to determine the effects of different doses of EPO, administered acutely after injury, on the cortical concentrations of interleukin-1 (IL-1) and macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) for up to 24 h following brain trauma.

## Methods

All procedures in this study were approved after review by the University of Edinburgh ethics committee and the United Kingdom Home Office. Procedures were performed in accordance with the Animals (Scientific Procedures) Act 1986 and European Union (directive 86/609) guidelines regulating animal experimentation. The animals had free access to food and water, and were allowed to acclimatize to the light/dark cycle and room temperature for at least 1 week before the study began.

### *Lateral fluid percussion injury*

Adult male Sprague-Dawley rats (Charles River UK Ltd., Margate, United Kingdom) weighing 350–400 g were anesthetized using isoflurane in oxygen and brain injury performed using the lateral FPI technique as previously described (McIntosh et al., 1989). In brief, each animal was placed in a stereotaxic frame, and via a midline incision, the scalp, temporal muscle, and periosteum were exposed and reflected from the skull. A 5-mm craniotomy was trephined freehand, without disrupting the dura, over the left parietal cortex, midway between the bregma and lambda, and 4 mm lateral to the sagittal suture. A hollow female Luer-Lock fitting was then fixed to the margins of the craniotomy and secured with dental acrylic poured around the Luer-Lock fitting. The female fitting was filled with saline. The FPI device consisted of a Plexiglas cylindrical reservoir enclosed at one end by a piston mounted on "O" rings. Adjacent to the

plunger is a large metal hammer. This could be displaced from the vertical and, when released, impacted with the plunger producing a pressure increase in the cylinder fluid. The amplitude of this pressure wave was proportional to the deflection of the hammer from the vertical. The pressure wave was detected by a pressure transducer mounted at the opposite end of the reservoir in a metal housing, which was connected to a transfer tube that terminated in a male Luer-Lock fitting. At the time of injury, this tube was connected to the female Luer-Lock fitting that had been fixed over the exposed left parietal cortex of the rat. The FPI device thus consisted of a fluid-filled cylinder in continuity with the dura. When the hammer was released from a predetermined position, the device produced a pulse of increased intracranial pressure of consistent duration (20 msec). Brief displacement and deformation of neural tissue resulted from this rapid epidural injection of saline into the closed cranial cavity. All animals were injured at a moderate injury level (1.6–1.8 atm). Core body temperature was measured rectally and was maintained within normal limits by a feedback controlled heating pad during the procedure. Following injury, the Luer-Lock fitting was removed, the wound was closed, and then it was infiltrated with bupivacaine. The animals were initially kept warm in a rodent incubator and, once mobilizing, were returned to their cages where they had free access to food and water.

### *EPO administration*

EPO (0, 1000, 3000, 5000 U/kg) was diluted in saline to reach a final bolus volume of 1 mL. Doses were prepared in a randomized sequence in identical syringes. The operator was blinded to the contents of the syringe. The drug was administered immediately following brain trauma at different dosages using IP or intravenous (IV; penile vein) routes.

### *Sample processing*

Under deep anesthesia, animals were sacrificed at designated time points after brain trauma (4, 8, 12, 24 h). Animals in the pharmacokinetic experiments were deeply anesthetized with Isoflurane and sacrificed by transcardiac perfusion with heparinized (10 U/mL) 0.1 M phosphate-buffered saline, pH 7.4 (PBS).

Following decapitation, the brains were rapidly removed and then sectioned coronally, isolating a 4-mm slice of tissue at the level of the craniotomy, containing the anterior and mid hippocampus. From this coronal section, the medial extremes of the cortex were trimmed. The major remaining segments of the ipsi- and contralateral cortex were dissected free, separated, snap frozen in liquid nitrogen, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analyzed.

Cortical tissue samples were weighed and homogenized on ice in four volumes of extraction buffer consisting of 150 mM sodium chloride, 50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride and 1% Triton X-100 (pH to 7.2) with proteinase inhibitor cocktail (10  $\mu\text{L}/10\text{ mL}$ ; P8340; all Sigma-Aldrich Company Ltd.). These were then agitated for 90 min at  $4^{\circ}\text{C}$  and centrifuged for 15 min at 3000g. The resulting supernatants were aspirated, and IL-1, MIP-2 (Biosource), and EPO (R&D Systems) concentrations were determined by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to the manufacturer's instructions.

Cytokine concentrations were standardized against total protein concentration in the homogenates using a bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL).

EPO blood collections were made by direct intracardiac sampling before transcardiac perfusion. Blood was then centrifuged at 6500g for 10 min at room temperature, and supernatant was removed and frozen at -80°C for further analysis. EPO blood concentrations were determined using ELISA kits (R&D system), according to the manufacturer's instructions.

## Experiments

### Pharmacokinetics

**Experiment 1. Effect of intraperitoneal EPO administration.** To assess the pharmacokinetics of EPO, rats were administered IP EPO (0, 1000, 3000, or 5000 U/kg;  $n = 5$  per dose) following FPI and then sacrificed 4 h later. In a subsequent set of experiments, 5000 U/kg EPO was administered IV following FPI, and the EPO concentrations were measured in the blood and cortex at 4, 8, 12, and 24 h post-injury ( $n = 5$  per time point).

**Experiment 2. Effect of intravenous EPO administration.** To test the hypothesis that IV EPO would result in higher concentrations in the brain than when given IP, in one set of experiments EPO 5000 U/kg was injected into the penile vein following FPI, and the animals were sacrificed 4 h later ( $n = 5$ ).

**Experiment 3. Contribution of blood and brain EPO to the total cortical concentrations.** Additionally, brain EPO concentrations in non-perfused and perfused cerebral tissue were measured to determine the contribution of the blood compartment to the total measure. A large discrepancy was possible if EPO did not cross the BBB readily. Rats received either EPO IP ( $n = 10$ ) or IV ( $n = 10$ ) 5000 U/kg and were sacrificed 4 h after FPI. Rats were randomized for routes of injection and perfusion. Transcardiac perfusion was performed in half of the animals in the IP and IV groups. An intracardiac blood sample was collected before perfusion, for blood EPO concentration determination.

### Pharmacodynamics

**Experiment 4. Effect of intraperitoneal EPO on cortical IL-1 and MIP-2.** To investigate the anti-inflammatory effect of a single injection, EPO (0, 1000, 3000, and 5000 U/kg;  $n = 5$  per dose) was administered IP immediately after FPI, and animals were sacrificed at 4 h later. In a separate set of experiments, EPO (5000 U/kg) was administered IV immediately after FPI, and rats were killed at 4, 8, 12, and 24 h after injury ( $n = 5$  per time point). Cortical IL-1 and MIP-2 concentrations were determined. A parallel group of animals subjected to FPI but given an injection of saline served as controls ( $n = 5$ ).

### Statistical analysis

All the data were stored in an Excel spreadsheet, and SPSS software was used for statistical analysis. The statistical test used was a Mann-Whitney *U*-test because of a non-normal

distribution of the results due to the small sample sizes (five rats per group). We used the Bonferroni criterion because of multiple comparisons ([www.bmj.com/cgi/content/full/310/6973/170](http://www.bmj.com/cgi/content/full/310/6973/170)) and therefore considered a result significant if  $p < 0.0125$ .

## Results

### Pharmacokinetics: Effect of IP and IV EPO administration

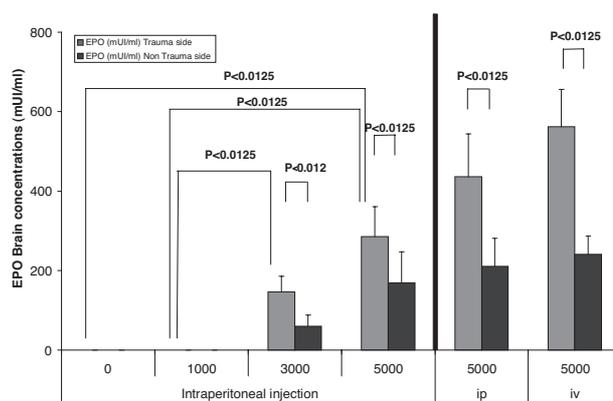
At 4 h following FPI, EPO was detectable in the cortex of all rats receiving 5000 U/kg and in half of the animals receiving 3000 U/kg. It was below detection threshold for all rats receiving 1000 U/kg and placebo (Fig. 1). EPO concentrations were significantly higher in the ipsilateral cortex side compared to the contralateral side ( $p = 0.0125$ ).

IV administered EPO (5000 U/kg) produced a slightly greater increase in cortical EPO concentration on both the ipsilateral traumatized and contralateral tissue compared to the same dose administered IP; however, this was not statistically significant (Fig. 1).

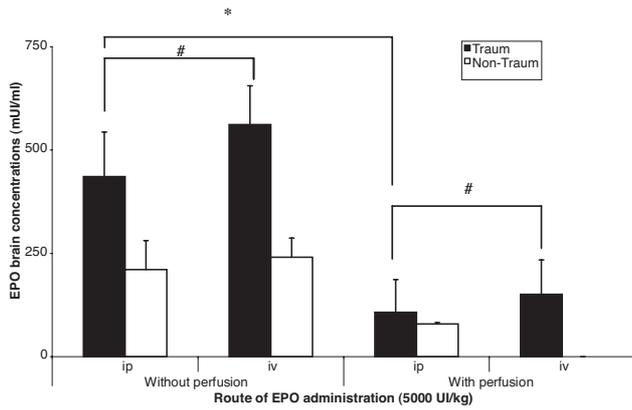
Transcardiac perfusion reduced the cortical EPO concentration by a factor of five on both sides of the cortex. The decrease was such that, with IV-injected EPO, the brain concentrations could no longer be detected on the nontraumatized side (Fig. 2). Over the 24-h period following FPI, blood and cortical concentrations of EPO declined, as to be expected; however, the level within the contralateral side declined the most rapidly and had almost returned to pre-injection levels by the end of the recording period (Fig. 3). Taken together these results indicate that a larger proportion of the cortically measured EPO was located within the cerebral blood volume and not in the cortex.

### Pharmacodynamics: Effect of EPO on IL-1 or MIP-2

The two cytokines showed different patterns of activity following FPI. IL-1 reached a peak at 8 h on both ipsi- and contralateral sides and then slowly declined back to injury levels at 24 h (Fig. 4). MIP-2 on the other hand peaked at 4 h post-injury on the ipsilateral side dropping back to a third



**FIG. 1.** Cortical EPO concentrations in rats sacrificed 4 h post-FPI. Animals were administered intraperitoneal EPO (0, 1000, 3000, 5000 U/kg;  $n = 5$ ). Intraperitoneal injection of EPO leads to a dose-dependent increase in cortical EPO concentration which was greater in the traumatized ipsilateral cortex.

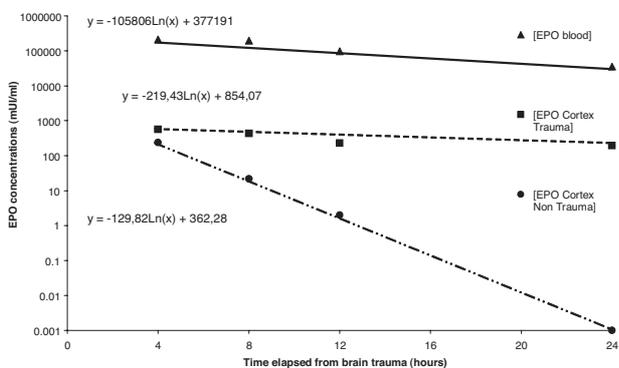


**FIG. 2.** Cortical EPO concentrations following intraperitoneal (IP) or intravenous (IV) route and with or without transcerebral perfusion. IV injection of 5000 U/Kg EPO produced a greater cortical concentration of EPO than IP injection of the same dose, but this was not statistically significant ( $#p < 0.0125$ ). Cortical EPO concentrations were significantly modified by removing the cerebral blood volume with transcerebral perfusion following either intraperitoneal or intravenously injected EPO, 5000 U/kg at 4 h post-FPI ( $n = 5$  per group). Brain concentrations were reduced by at least a fivefold factor on both the ipsilateral and contralateral cortices for both routes of injection ( $*p < 0.0125$ ).

of pre-injury levels by 12–24 h (Fig. 5). On the contralateral side, the increase in MIP-2 was not as dramatic, peaking at 8 h, where it remained constant up to the end of the recording period. EPO reduced the increase in IL-1 at 8–24 h and blocked the increase seen on the contralateral side. Similar to the effect on IL-1, EPO had no effect on the levels of MIP-2 at 4 h but accelerated its decline on the ipsilateral side. This was statistically significant at 12–24 h. On the contralateral side, EPO significantly reduced MIP-2 concentrations over the 8–24-h time window.

**Discussion**

The data from this study suggest that human EPO crossed the BBB by 4 h after brain trauma at doses over 3000 U/kg



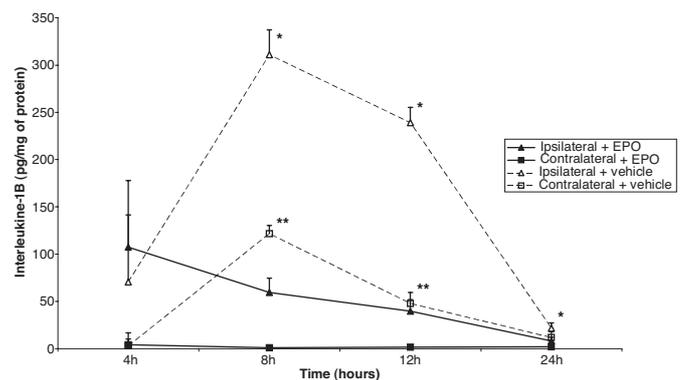
**FIG. 3.** The concentration of EPO in the blood and ipsilateral traumatized and contralateral cortex following fluid percussion injury and intraperitoneal injection of EPO (5000 U/kg;  $n = 5$  per group) over 24 h without transcerebral perfusion.

administered by either the IV or IP route. Surprisingly, the IV route did not seem to significantly assist the penetration into the cortex. The data from the transcerebral perfusion experiments also suggest that most of the EPO present in the brain at this time point is present within the vascular compartment and has not passed through the BBB. The fact that EPO concentrations were much higher in the traumatized cortex over the 24-h study period indicates that a transient breakdown of the BBB may be required to facilitate its penetration into the brain. The results are similar to the findings of Brines et al. (2000) and fit with what is known of EPO’s hydrophilic properties. It does not explain however why the decrease in EPO in the non-trauma cortex declined at a much higher rate than on the traumatized side.

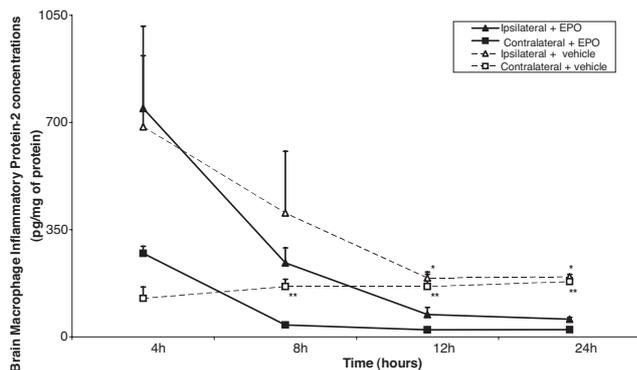
Despite the fact that EPO was present in the brain at this time, it did not appear to affect either IL-1 or MIP-2 concentrations in the cortex in the first 4 h post-injury. At this time point and up to 8 h on the ipsilateral side, IL-1 increased before falling back steadily to baseline levels within 24 h. A similar pattern of increase was observed on the contralateral side. The time-course of this increase concurs with that described by other researchers of inflammation after head injury (Kamm et al., 2006; Fan et al., 1995; Kinoshita et al., 2002b; Taupin et al., 1993b).

Reduction in concentrations of both cytokines were only seen at later time points during the first 24 h after injury. A short interval, up to 24 h post-trauma, was studied because there are limited reports of the acute anti-inflammatory effects of EPO at this time, and it is during this period that the inflammatory response following lateral FPI is largely activated.

There are three possible explanations to account for the lack of an early effect of EPO on inflammatory mediator concentrations. The first is that EPO was unable to cross the BBB quickly enough to modulate cytokine expression. This seems unlikely since Brines et al. (2000) showed the ability of EPO to enter the brain by 5 h post-injury. In the present study, EPO reached higher concentrations in the brain on the ipsi-



**FIG. 4.** Cortical IL-1 concentrations (pg/mg of protein) over the first 24 h following FPI and its modification by EPO 5000 U/kg injected intravenously ( $n = 5$  per group). IL-1 concentrations were significantly decreased by EPO in the ipsilateral traumatized cortex at 8, 12, and 24 h post-injury ( $*p < 0.0125$ ). EPO administration also prevented the increase in IL-1 at 8 and 12 h post-injury in the contralateral cortex ( $**p < 0.0125$ ).



**FIG. 5.** Cortical MIP-2 concentrations over the first 24 h following FPI and its modulation by EPO injected intravenously (5000 U/kg;  $n = 5$  per group). Cortical MIP-2 concentrations were significantly decreased in the ipsilateral traumatized side by EPO at time 12 and 24 h post-injury ( $*p < 0.0125$ ). EPO significantly reduced the MIP-2 concentration in the contralateral cortex at 8, 12, and 24 h ( $**p < 0.0125$ ).

lateral traumatized hemisphere compared with the contralateral side, suggesting that penetration was aided by a compromised BBB.

The second explanation is that EPO has some pro-inflammatory effects at the higher dosages employed here. This also seems unlikely because we were not able to demonstrate an increase in the brain inflammatory protein concentrations associated with increasing EPO dosages. Some studies have shown that large doses of EPO (10,000 U/kg) in cell culture are associated with a lack of efficacy in comparison to lower concentrations (Siren et al., 2001, 2006), but these studies examined the anti-apoptotic properties of EPO following ischemia. To our knowledge, this is the first study to report on the early effect of EPO, that is, within the first 24 h in any model of brain injury. And we did not find an IL-1 $\alpha$ -to-EPO dose relationship in this model using three different EPO dosages.

The third explanation is that the 4-h time window was too short to show a biochemical effect on inflammatory mediator concentrations. We have demonstrated significant anti-inflammatory properties of EPO on IL-1 $\alpha$  and MIP-2 inhibition at the later time points out to 24-h post-trauma.

The 24-h after injury period was chosen for this study because it has been demonstrated that IL-1 $\alpha$  and MIP-2 brain concentrations returned to normal values within 1 day post-trauma in this and other focal injury models. For example, Kinoshita et al. (2002) measured IL-1 $\alpha$  protein expression in cortex showing that it peaked between 1 and 24 h, with the highest cortical concentrations at 3 h with concentrations dependent on the severity of the brain trauma injury. Similarly, Knoblach and Faden (2000) observed that protein IL-1 $\alpha$  concentrations in the cortex peaked 4 h after TBI (58–77 pg/mg of protein). Consistently, we have also demonstrated an increase in cortical IL-1 $\alpha$ , which peaks within the first 24 h after injury in agreement with previous studies (Kinoshita et al., 2002a; Knoblach et al., 2000; Taupin et al., 1993a).

We showed a significant effect of EPO in the traumatized cortex, and we were able to demonstrate a significant reduction of the small increase of IL-1 $\alpha$  in the contralateral

side, similar to published data (Kinoshita et al., 2002). In contrast, however, by focusing on different time points between 4 and 24 h, we showed a significant reduction in the IL-1 concentration in the contralateral as well as in the traumatized side (Fig. 4).

The lateral FPI model of traumatic brain injury is considered to create a transient BBB opening that lasts a few hours; however, some authors have observed a prolonged BBB breakdown of up to 5 h, which is reduced by the use of EPO in TBI models of diffuse axonal injury (Verdonck et al., 2007) and cryogenic lesion (Grasso et al., 2007). In the ipsilateral tissue, the concentration remains high due to prolonged opening of the BBB due to trauma and secondary inflammatory processes (Cortez et al., 1989; Soares et al., 1995). Interestingly, the EPO concentration fell rapidly in the contralateral cortex between 4 and 24 h following brain trauma (Fig. 3).

In conclusion, we have studied EPO distribution in the brain cortex following lateral FPI and its effects on IL-1 $\alpha$  and MIP-2 concentrations, two important biochemical mediators involved in early post-traumatic inflammation. We found that high concentrations of EPO are required to reach significant brain concentrations early after injection. We also found greater concentrations of EPO in the injured cortex suggesting that BBB break-down is helping the drug to reach the target tissue. We have also shown a reduction in cortical IL-1 $\alpha$  and MIP-2 cortical concentrations in the injured cortex but only after 8 h. Finally, EPO blood concentrations remained elevated more than 24 h after a single injection following brain trauma, indicating that a longer time interval than 24 h may be used to assess the effects of EPO administration.

#### Acknowledgments

We wish to acknowledge the following for their help in funding the project: Hospices Civils de Lyon (Hospital Grant); University of Edinburgh (Critical Care Departmental Grant); and Agence Régionale d'Hospitalisation Rhone-Alpes (Grant).

#### Author Disclosure Statement

The authors have no financial conflicts to declare in relation to this work.

#### References

- Brines, M.L., Ghezzi, P., Keenan, S., Agnello, D., De Lanerolle, N.C., Cerami, C., Itri, L.M., and Cerami, A. (2000). Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 10526–10531.
- Cortez, S.C., McIntosh, T.K., and Noble, L.J. (1989). Experimental fluid percussion brain injury: vascular disruption and neuronal and glial alterations. *Brain Res.* 482, 271–282.
- Csuka, E., Morganti-Kossmann, M.C., Lenzlinger, P.M., Joller, H., Trentz, O., and Kossmann, T. (1999). IL-10 levels in cerebrospinal fluid and serum of patients with severe traumatic brain injury: relationship to IL-6, TNF-alpha, TGF-beta1 and blood-brain barrier function. *J. Neuroimmunol.* 101, 211–221.
- Ehrenreich, H., Degner, D., Meller, J., Brines, M., Behe, M., Haselblatt, M., Woldt, H., Falkai, P., Knerlich, F., Jacob, S., Von Ahsen, N., Maier, W., Bruck, W., Ruther, E., Cerami, A.,

- Becker, W., and Siren, A.L. (2004). Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 9, 42–54.
- Ehrenreich, H., Fischer, B., Norra, C., Schellenberger, F., Stender, N., Stiefel, M., Siren, A.L., Paulus, W., Nave, K.A., Gold, R., and Bartels, C. (2007). Exploring recombinant human erythropoietin in chronic progressive multiple sclerosis. *Brain* 130, 2577–2588.
- Ehrenreich, H., Hasselblatt, M., Piotr, L., Dembowski, C., Cepek, L., Stiefel, M., Rustenbeck, H.H., Jacob, S., Knerlich, F., Gleiter, C., Prange, H., and Siren, A.L. (2002). Erythropoietin treatment for acute stroke: a randomized double-blind proof-of-concept trial in man. *Stroke* 33, 354.
- Fan, L., Young, P.R., Barone, F.C., Feuerstein, G.Z., Smith, D.H., and McIntosh, T.K. (1995). Experimental brain injury induces expression of interleukin-1 beta mRNA in the rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 30, 125–130.
- Gorio, A., Madaschi, L., Di Stefano, B., Carelli, S., Di Giulio, A.M., De Biasi, S., Coleman, T., Cerami, A., and Brines, M. (2005). Methylprednisolone neutralizes the beneficial effects of erythropoietin in experimental spinal cord injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 16379–16384.
- Grasso, G., Sfacteria, A., Meli, F., Fodale, V., Buemi, M., and Iacopino, D.G. (2007). Neuroprotection by erythropoietin administration after experimental traumatic brain injury. *Brain Res.* 1182, 99–105.
- Hayakata, T., Shiozaki, T., Tasaki, O., Ikegawa, H., Inoue, Y., Toshiyuki, F., Hosotubo, H., Kieko, F., Yamashita, T., Tanaka, H., Shimazu, T., and Sugimoto, H. (2004). Changes in CSF S100B and cytokine concentrations in early-phase severe traumatic brain injury. *Shock* 22, 102–107.
- Kamm, K., Vanderkolk, W., Lawrence, C., Jonker, M., and Davis, A.T. (2006). The effect of traumatic brain injury upon the concentration and expression of interleukin-1beta and interleukin-10 in the rat. *J. Trauma* 60, 152–157.
- Kinoshita, K., Chatzipanteli, K., Vitarbo, E., Truettner, J.S., Alonso, O.F., and Dietrich, W.D. (2002). Interleukin-1beta messenger ribonucleic acid and protein levels after fluid-percussion brain injury in rats: importance of injury severity and brain temperature. *Neurosurgery* 51, 195–203.
- Knobloch, S.M., and Faden, A.I. (2000). Cortical interleukin-1 beta elevation after traumatic brain injury in the rat: no effect of two selective antagonists on motor recovery. *Neurosci. Lett.* 289, 5–8.
- Kumral, A., Uysal, N., Tugyan, K., Sonmez, A., Yilmaz, O., Gokmen, N., Kiray, M., Genc, S., Duman, N., Koroglu, T.F., Ozkan, H., and Genc, K. (2004). Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Behav. Brain Res.* 153, 77–86.
- Lee, S.T., Chu, K., Sinn, D.I., Jung, K.H., Kim, E.H., Kim, S.J., Kim, J.M., Ko, S.Y., Kim, M., and Roh, J.K. (2006). Erythropoietin reduces perihematomal inflammation and cell death with eNOS and STAT3 activations in experimental intracerebral hemorrhage. *J. Neurochem.* 96, 1728–1739.
- Lu, D., Mahmood, A., Qu, C., Goussev, A., Schallert, T., and Chopp, M. (2005). Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 22, 1011–1017.
- Marshall, L.F. (2000). Head injury: recent past, present, and future. *Neurosurgery* 47, 546–561.
- McClain, C.J., Cohen, D., Ott, L., Dinarello, C.A., and Young, B. (1987). Ventricular fluid interleukin-1 activity in patients with head injury. *J. Lab. Clin. Med.* 110, 48–54.
- McIntosh, T.K., Vink, R., Noble, L., Yamakami, I., Fernyak, S., Soares, H., and Faden, A.L. (1989). Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. *Neuroscience* 28, 233–244.
- Nadam, J., Navarro, F., Sanchez, P., Moulin, C., Georges, B., Laglaine, A., Pequignot, J.M., Morales, A., Ryvlin, P., and Bezin, L. (2007). Neuroprotective effects of erythropoietin in the rat hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiol. Dis.* 25, 412–426.
- Otto, V.I., Stahel, P.F., Rancan, M., Kariya, K., Shohami, E., Yatsiv, I., Eugster, H.P., Kossmann, T., Trentz, O., and Morganti-Kossmann, M.C. (2001). Regulation of chemokines and chemokine receptors after experimental closed head injury. *Neuroreport* 12, 2059–2064.
- Ozisk, P.A., Oruckaptan, H., Geyik, P.O., Misirlioglu, M., Sargon, M.F., Kilinc, K., and Ozgen, T. (2007). Effect of erythropoietin on brain tissue after experimental head trauma in rats. *Surg. Neurol.* 68, 547–555.
- Ross, S.A., Halliday, M.I., Campbell, G.C., Byrnes, D.P., and Rowlands, B.J. (1994). The presence of tumour necrosis factor in CSF and plasma after severe head injury. *Br. J. Neurosurg.* 8, 419–425.
- Siren, A.L., Fratelli, M., Brines, M., Goemans, C., Casagrande, S., Lewczuk, P., Keenan, S., Gleiter, C., Pasquali, C., Capobianco, A., Mennini, T., Heumann, R., Cerami, A., Ehrenreich, H., and Ghezzi, P. (2001). Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4044–4049.
- Siren, A.L., Radyushkin, K., Boretius, S., Kammer, D., Riechers, C.C., Natt, O., Sargin, D., Watanabe, T., Sperling, S., Michaelis, T., Price, J., Meyer, B., Frahm, J., and Ehrenreich, H. (2006). Global brain atrophy after unilateral parietal lesion and its prevention by erythropoietin. *Brain* 129, 480–489.
- Soares, H.D., Hicks, R.R., Smith, D., and McIntosh, T.K. (1995). Inflammatory leukocytic recruitment and diffuse neuronal degeneration are separate pathological processes resulting from traumatic brain injury. *J. Neurosci.* 15, 8223–8233.
- Taupin, V., Toulmond, S., Serrano, A., Benavides S.J., and Zavala, F. (1993). Increase in IL-6, IL-1 and TNF levels in rat brain following traumatic lesion. Influence of pre- and post-traumatic treatment with Ro5 4864, a peripheral-type (p site) benzodiazepine ligand. *J. Neuroimmunol.* 42, 177–185.
- Valles, A., Grijpink-Ongering, L., De Bree, F.M., Tuinstra, T., and Ronken, E. (2006). Differential regulation of the CXCR2 chemokine network in rat brain trauma: implications for neuroimmune interactions and neuronal survival. *Neurobiol. Dis.* 22, 312–322.
- Verdonck, O., Lahrech, H., Francony, G., Carle, O., Farion, R., Van De Looij, Y., Remy, C., Segebarth, C., and Payen, J.F. (2007). Erythropoietin protects from post-traumatic edema in the rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 1369–1376.
- Villa, P., Bigini, P., Mennini, T., Agnello, D., Laragione, T., Cagnotto, A., Viviani, B., Marinovich, M., Cerami, A., Coleman, T.R., Brines, M., and Ghezzi, P. (2003). Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J. Exp. Med.* 198, 971–975.
- Xenocostas, A., Cheung, W.K., Farrell, F., Zaksewski, C., Kelley, M., Lutynski, A., Crump, M., Lipton, J.H., Kiss, T.L., Lau, C.Y., and Messner, H.A. (2005). The pharmacokinetics of erythropoietin in the cerebrospinal fluid after intravenous administration of recombinant human erythropoietin. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 61, 189–195.
- Yatsiv, I., Grigoriadis, N., Simeonidou, C., Stahel, P.F., Schmidt, O.I., Alexandrovitch, A.G., Tsenter, J., and Shohami, E. (2005). Erythropoietin is neuroprotective, improves functional recovery

ery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury. *FASEB J.* 19, 1701–1703.

Zhu, T., Yao, Z., Yuan, H.N., Lu, B.G., and Yang, S.Y. (2004). Changes of interleukin-1 beta, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in brain and plasma after brain injury in rats. *Chin. J. Traumatol.* 7, 32–35.

Address reprint requests to:

*Peter J.D. Andrews, M.D.*

*Western General Hospital*

*Crewe Road South*

*Edinburgh, EH4 2XU, UK*

*E-mail: p.andrews@ed.ac.uk*

## 8. CONCLUSION

---

Au terme de ce travail, initié chez l'homme en raison des besoins de thérapeutiques neuroprotectrices, les questions concernant l'introduction de l'Epo-rh pour des patients ayant eu un traumatisme du système nerveux central restent nombreuses. Notre recherche a comporté trois étapes : i) pour expliquer l'échec d'une étude de l'Epo-rh pour les TMD chez l'homme, nous avons d'abord exploré l'épidémiologie des traumatismes médullaires après accident de la circulation ; ii) puis nous avons caractérisé la réponse cérébrale à un TC expérimental réalisé par LFPI (1,6-1,8 atm) à l'aide de mesures histologiques, protéiques, géniques, en IRM et neurocomportementales et enfin iii) nous avons identifié les effets de l'Epo-rh sur les variables sur lesquelles nous avons enregistré des modifications significatives après un tel traumatisme.

- 1- La première étape aura montré qu'on ne pourra faire avancer les prochaines études de pharmacologie, de tolérance et même d'efficacité de l'Epo-rh sur le TMD, qu'à condition d'entreprendre des études multicentriques en France. En effet, le recrutement de ces patients a changé et ceux-ci sont dorénavant plus âgés et plus souvent polytraumatisés.
- 2- L'incidence faible des TMD chez l'homme nous a poussé à nous tourner vers le traumatisme crânien pour lequel le Registre d'accident du Rhône a montré que l'incidence du TC était 10 fois plus élevée que celle du TMD après accident de la circulation. Nous vérifierons que l'évolution de l'incidence des TC mineurs, modérés et graves dans le Registre, nous permettra de bien cibler les populations sur lesquelles nous imaginons pouvoir identifier les effets neuroprotecteurs de molécules telles que l'Epo-rh. Entre temps, nous avons choisi d'étudier le TC chez l'animal. Nous avons rencontré des difficultés dans la conduite du travail bibliographique et expérimental, dues au fait que, la diversité des modèles employés réunis sous le sigle TC expérimental, et les changements induits par la modernisation des techniques d'appréciation des troubles neurocomportementaux, nous ont obligé à redéfinir les notions de sévérité du TC expérimental chez le rongeur. Nous avons dénombré au moins 4 modèles de traumatismes crâniens expérimentaux. La diversité des contraintes lésionnelles appliquées dans les différents modèles montre que chaque étude doit préciser les mécanismes complets du modèle traumatique ainsi que la mortalité dans la série étudiée, ce qui est rarement le cas dans la littérature. Pour l'heure, il n'existe que très peu d'équipes ayant publié des

résultats permettant de déduire les niveaux de contraintes lésionnelles de différents traumatismes pour des correspondances neurocomportementales, histologiques et en IRM. De plus, les résultats obtenus chez la souris ne peuvent être extrapolés à ceux attendus pour des contraintes lésionnelles de traumatisme équivalentes chez le rat. Ceci signifie que les résultats obtenus par certains à l'aide d'un modèle de TC expérimental dans l'une des espèces doivent obligatoirement être vérifiés dans l'autre espèce.

De plus, l'évaluation des troubles neurocomportementaux, qui reste l'objectif principal de toute stratégie thérapeutique à vocation neuroprotectrice, n'est pas standardisée entre les équipes. Si des troubles mnésiques ont été observés chez les rongeurs, ils l'ont souvent été avec des niveaux de traumatismes sévères voire majeurs (en CCI ou LFPI). Or, dans les expériences que nous avons réalisées, nous mettons en évidence des troubles du comportement à type d'hyperlocomotion, troubles transitoires, sans anomalies de la substance blanche associées mesurées à l'IRM-DTI. L'ensemble du tableau se rapproche, chez l'homme, de ce qui est défini comme un TC mineur. Nous interprétons ce trouble du comportement locomoteur soit comme une augmentation du niveau d'anxiété, soit comme une levée de l'inhibition ou de la peur, chez le rat.

En revanche, même avec très peu de signes cliniques et aucune anomalie des mesures au niveau de la substance blanche en IRM-DTI, ce TC expérimental, même mineur, s'accompagne de modifications substantielles au niveau histologique et biochimique. Les modifications histologiques rapportées dans notre modèle correspondent à celles retrouvées dans la littérature. Là encore, le manque de données sur des analyses automatisées des comptages cellulaires et l'utilisation des « nouveaux » marquages cellulaires comme NeuN, considéré comme une référence dans l'identification des neurones, font défaut dans la littérature. Nous sommes en bonne voie de valider de nouvelles méthodes de comptages pour montrer que le nombre de cellules neuronales est bien diminué, d'une part dans l'hippocampe au niveau du hile du gyrus denté et d'autre part, au niveau de la partie latérale du cortex pariétal, à la jonction avec le cortex temporal. Cette perte neuronale pourrait être en rapport avec la sévérité du traumatisme, mais ceci reste à vérifier.

Par ailleurs, nous avons identifié une forte réponse inflammatoire, même après un TC mineur. Une activation microgliale, identifiée à l'aide de l'antigène CD11-b, prédominante au 7<sup>e</sup> jour après le LFPI, accompagne et prolonge la réaction génique inflammatoire cérébrale, impliquant de nombreuses cytokines et chimiokines. Cette variation des transcrits, codants pour l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, le TNF $\alpha$  et la chimiokine MCP-1,

est également très transitoire. Cette réponse génique a été identifiée à l'aide d'une méthode parfaitement calibrée et standardisée, avec un décours temporel marqué par une explosivité à la 10<sup>e</sup> heure (x50 à x150) selon les cytokines analysées. Le thalamus dorsal est la structure qui dévoile, à l'état de base, le plus faible nombre de copies d'ARNm des différentes molécules inflammatoires analysées, mais c'est aussi la structure qui voit la plus forte augmentation après LFPI pour presque toutes les réponses géniques des molécules analysées. La réponse protéique inflammatoire au niveau cortical est également importante et transitoire. Enfin il existe une réponse inflammatoire génique et protéique de l'hémisphère controlatéral à la lésion, maximale à la 10<sup>e</sup> heure après LFPI mais beaucoup moins importante. Cette réponse controlatérale traduit une agression cérébrale globale à un traumatisme considéré comme local, ce qui avait déjà été montré dans un modèle de cryolésion (Siren, 2006)

La réponse du système Epoergique a également été étudiée dans le laboratoire et nous avons montré que la présence du récepteur à l'Epo (EpoR) était indispensable à l'efficacité potentielle de l'Epo-rh (Sanchez 2009). Comme pour la réponse inflammatoire, l'expression génique du système Epoergique est régulée de façon différente selon les structures cérébrales analysées après un traumatisme. Dans le cortex traumatisé, on a observé une diminution temporaire du nombre des transcrits de l'Epo alors que dans toutes les autres structures, on a observé une augmentation progressive sur les 7 jours consécutifs au LFPI. Ceci pourrait traduire le fait que les neurones, principales sources d'Epo, endommagés par le LFPI, sont incapables de synthétiser l'Epo. Ce résultat plaiderait pour l'administration d'Epo exogène pour suppléer précisément à l'incapacité endogènes des neurones à répondre au traumatisme afin de promouvoir un mécanisme compensateur renforçant la résistance à l'apoptose.

3- S'agissant des effets de l'Epo-rh au niveau du système nerveux central (encéphale et moelle épinière), de très nombreuses études ont déjà montré des effets favorables de cette molécule dans différents modèles d'agression cérébrale ischémique, épileptique, chimique, et en particulier traumatique, encéphalique ou médullaire. Cependant, la plupart des études se sont focalisées sur des critères intermédiaires d'efficacité comme des marqueurs de la réaction inflammatoire histologique ou biochimique, des marqueurs d'apoptose ou encore de troubles de la perméabilité vasculaire oedémateuse ou cytotoxique, ou des variables obtenues en imagerie. Beaucoup plus rarement, les études ont montré des effets favorables de l'Epo-rh sur les troubles neurocomportementaux

induits par un traumatisme du système nerveux central. Les études des effets neurocomportementaux de l'Epo-rh sur le TMD chez l'animal sont bien plus nombreuses actuellement, que celles sur le TC expérimental. En étudiant les effets de l'Epo-rh sur différentes variables significativement modifiées par un LFPI mineur, nous avons pu montrer que l'Epo-rh réduisait les concentrations de protéines inflammatoires dans le cortex mais était sans effet sur l'augmentation du nombre de transcrits de ces mêmes molécules. Des questions restent en suspens pour expliquer cette dissociation des résultats.

4- Enfin, nous avons caractérisé en partie la pharmacocinétique de l'Epo-rh après LFPI mineur et nous avons montré que l'Epo-rh n'était détectable, au niveau cortical, que pour des posologies supérieures ou égales à 3000 UI/kg après LFPI. Les concentrations corticales détectées 4h après l'injection étaient équivalentes quelle que fut la voie d'injection choisie (intrapéritonéale ou intraveineuse). Enfin, les concentrations d'Epo-rh étaient plus élevées dans le cortex du côté traumatisé, et elles étaient toujours détectables à la 24<sup>e</sup> heure après l'injection de ce même côté ce qui n'était plus le cas du côté opposé au traumatisme. Le ratio entre les concentrations plasmatiques et cérébrales d'Epo-rh était d'environ 1%.

Au total, nous n'avons pas pu montrer le bénéfice de l'Epo-rh dans la promotion de la neuroprotection après un LFPI de 1,6-1,8 atm si l'on s'en tient à un bénéfice fonctionnel car :

- a- nous avons montré que le LFPI effectué induit un TC mineur chez l'animal avec très peu de manifestations cliniques et peu de lésions IRM-DTI. Dans ces conditions, il est difficile de montrer des effets neuroprotecteurs sans avoir préalablement induit un déficit neurocomportemental. En d'autres termes, en étudiant ce qui est décrit comme un TC modéré, nous avons montré en fait qu'il s'agissait d'un TC mineur. Pour pouvoir montrer des effets neuroprotecteurs, il nous faudra changer les intensités de traumatisme afin d'induire des déficits neurologiques plus marqués et à plus long terme.
- b- Ensuite, il n'est pas certain que l'Epo-rh soit un bon candidat au statut de molécule anti-inflammatoire. En effet la réponse inflammatoire cérébrale a surtout pour soutien anatomique les cellules astrocytaires et microgliales, dont nous avons montré qu'elles n'exprimaient que très faiblement le récepteur EpoR *in vivo* dans les conditions basales, réduisant de ce fait la possibilité de répondre à l'Epo-rh (Sanchez 2009). Par ailleurs, des études antérieures avaient montré que l'Epo-rh n'avait aucun effet sur

l'inflammation cérébrale médiée par les cellules astrocytaires et microgliales (Villa 2003). Cependant, il existe bien une réduction des concentrations protéiques en IL-1 $\beta$  et MIP-2 sans modifications de la réponse génique. La provenance de ces protéines, sensibles à l'action de l'Epo-rh, reste à démontrer.

Les limites tant de nos capacités d'inclusion chez l'homme, que des modifications des paradigmes des études précliniques nous enjoignent néanmoins, en l'absence d'alternatives pharmacologiques, à poursuivre les études précliniques mais aussi cliniques chez l'homme souffrant de TMD, tant que l'affirmation définitive de l'efficacité, de l'inefficacité, ou de la dangérosité de l'Epo-rh, ne seront pas formellement établies. D'autre part, on ne doit pas attendre de l'Epo-rh une résurrection des cellules et des voies de communications axonales mais plus un appoint dans l'abord multidimensionnel de la prise en charge moléculaire, cellulaire, hémodynamique, en réadaptation fonctionnelle et en microchirurgie stéréotaxique qu'on peut espérer voir proposer aux patients dans les prochaines années. Enfin, la caractérisation des effets neurocomportementaux d'un LFPI modéré ou sévère devrait permettre de mettre en évidence plus facilement les effets de l'Epo-rh et de renforcer, éventuellement, les arguments en faveur de son utilisation chez l'homme...

Au regard des résultats disponibles dans la littérature expérimentale et de l'absence de thérapeutique pharmacologique neuroprotectrice actuellement disponible, ayant peu d'effets secondaires et possédant un tel recul quant à sa toxicité chez l'homme depuis sa mise sur le marché, une étude testant les effets de l'Epo-rh chez les patients avec TMD reste, toujours et autant, nécessaire et justifiée.

Il nous reste encore au moins une montagne et demi à gravir...

## 9. ANNEXES

---

### 9.1. *Annexes 1 Etude TETRAM*

□

## Etude TETRAM

### (Traitement par l'Epo des TRAAumatisés Médullaires : recherche de la dose maximum tolérée)

#### 9.1.1.1. Résumé synoptique

##### 9.1.1.1.1. *Argumentaire et objectifs*

L'érythropoïétine (EPO) représente un espoir thérapeutique dans le traumatisme médullaire déficitaire (TMD). En effet, des effets neuroprotecteurs ont été démontrés *in vitro* et *in vivo* chez l'animal à des doses allant de 500 à 5000 UI/kg. Une étude chez l'homme, contre placebo, dans l'accident vasculaire cérébral ischémique a démontré un bénéfice clinique, biologique et radiologique de l'EPO à la dose de 500 UI/kg pendant 3 jours. Notre objectif général est de démontrer l'efficacité de l'EPO dans le TMD chez l'homme. Cette première étude a pour objectif de rechercher la **dose maximum tolérée (DMT) en terme de risque thrombo-embolique (embolie pulmonaire, EP)**, et éventuellement les effets des doses testées dans cette indication, sur un (ou des) marqueur(s) biologiques ou radiologiques.

#### 9.1.1.2. Méthode

Plan expérimental : essai clinique en double insu avec administration d'une dose unique d'EPO. La dose à administrer sera choisie selon une méthode Bayésienne, parmi les doses testées : 600, 1200, 1800 et 2400 UI/kg, en fonction d'une hypothèse pré-établie (incidence d'EP de 5 à 18,9 % dans la population des TMD).

Critère de jugement : le critère principal de tolérance est la survenue d'une EP entre J0 et J14. Les critères secondaires incluent l'évolution clinique du TMD, l'IRM et des biomarqueurs cellulaires d'inflammation et d'apoptose dans le sang et le LCR.

Les critères d'inclusion principaux sont l'administration du traitement dans les 12 heures post-traumatiques, une absence de spoliation sanguine initiale ou imminente et une co-morbidité faible. Le suivi total est de 6 mois.

**Cette étude visant à déterminer la dose maximum tolérée de l'EPO dans le TMD est un préalable à une étude de la relation dose/effet.**

## 9.2. *Annexes histologie*

### Sacrifices et prélèvements tissulaires/ sanguins:

#### 1. *Pour le dosage des ARN messenger par RT-PCR*

Les rats ayant été soumis aux protocoles LFPI sont sacrifiés soit avant (NT) soit à la 10<sup>e</sup> heure, 24<sup>e</sup> heure ou au 7<sup>e</sup> jour (figure 7). Toutes les séries de sacrifices débutent à 15h00 et se déroulent au maximum sur 1 heure. Après anesthésie par injection i.p. à dose létale de 270mg/kg de pentobarbital sodique (Sanofi), les rats sont décapités à l'aide d'une guillotine. Une fois les cerveaux frais extraits de la boîte crânienne, le tissu est micro disséqué afin de prélever séparément les parties dorsale et ventrale de l'hippocampe et du thalamus et le néocortex. Les prélèvements tissulaires sont rapidement congelés dans l'azote liquide, puis transférés à -70°C. Les analyses ont portées sur le néocortex, l'hippocampe dorsal et le thalamus dorsal.

#### 2. *Pour la détection immunohistochimique*

##### 2.a Prélèvement des cerveaux

Après LFPI, les rats sont sacrifiés à différents temps (figure 14). Les rats sont anesthésiés par injection i.p. de pentobarbital sodique à la dose létale de 270mg/kg. Puis, ils sont perfusés avec un débit de perfusion à 70 mL/min, par voie intracardiaque (ventricule gauche) durant 2 minutes (min) avec un tampon phosphate salin (PBS) 0,1M, et pendant 10 min avec une solution à 4°C de paraformaldéhyde (PF) 4% préparé dans du tampon phosphate (PB) 0,1M. Après décapitation, les cerveaux sont post- fixés dans du PF 4% à 4°C pendant deux heures. Les tissus sont ensuite déshydratés durant 48h dans une solution à 4°C de saccharose 25% préparée dans du PB 0,1M. Les cerveaux sont congelés pendant 1 min et 10 secondes dans l'isopentane à -40°C avant d'être maintenus 30 min dans la carboglace. Enfin, les cerveaux congelés sont transférés à -70°C.

##### 2.b Coupe des cerveaux

Les cerveaux sont coupés en tranches coronales de 40 µm d'épaisseur à l'aide d'un cryostat (Leica) maintenu à -20°C. Les coupes sont récupérées tout le long de l'axe caudo-rostral

(Interaural: de 4,8 mm à 2,8 mm) de la structure hippocampique dans du PBS 0.1M. Les coupes "flottantes" sont ensuite transférées dans un tampon anti-congelant contenant 10% de solution PB à 0,2 M, 30% de glycérol, 30% d'éthylène glycol puis, conservées à -20°C.

Coloration immunologiques et immunohistochimiques

### 3. Détection immunohistochimique des protéines d'intérêts: NeuN et CD11b

Les coupes flottantes stockées dans la solution incongelable sont abondamment rincées avec une solution de PBS et placées durant une nuit à 4°C dans un bain de PBS 0,1 M (PBS). Le lendemain, les coupes sont incubées pendant 2 heures à TA dans du PBS-T-D contenant 2% de sérum normal d'âne, puis une nuit et un jour à 4 °C sous faible agitation, en présence d'une solution contenant les 2 anticorps primaires spécifiques des 2 antigènes d'intérêt, anticorps monoclonal de souris anti-NeuN (1/2000 ; MAB-377 ; Chemicon préparée et anticorps monoclonal de souris anti CD11b (1/2000 ; CBL-1512Z; Chemicon). A partir du jour suivant, toutes les étapes de la détection immunofluorescente sont réalisées à l'abri de la lumière. Les coupes sont rincées et incubées dans une solution préparée dans du PBS- T-D contenant les 2 anticorps secondaires spécifiques des anticorps primaires précédemment utilisés (sous faible agitation durant une nuit à 4°C puis 2 h à TA); les 2 anticorps secondaires sont couplés à des fluorochromes différents (Alexa-488 ou Alexa- 633). Après rinçages dans du PBS, les coupes sont montées sur lames SuperFrostPlus (Menzel-Glaser), séchées à TA et montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage histologique spécifique pour conserver la fluorescence (Vectashield, Vector). Ce milieu de montage contient du DAPI, un marqueur nucléaire qui fluoresce en bleu (excitation au laser). Les coupes incubent pendant 2 heures (TA) dans du PBS-T-D. Les biotines endogènes sont ensuite saturées à l'aide du kit de réactifs d'Abcys (n°SP2001) selon les recommandations du fournisseur. Après un rinçage de 5 min dans du PBS, les coupes incubent une nuit à TA sous agitation, en présence d'une solution contenant le peptide biotinylé diluée à 10 µM dans de l'eau UP. Le jour suivant, les coupes sont rincées dans du PBS 0.1M et incubent 15 min dans une solution contenant 0,1% de H2O2 à 30% diluée dans du PBS-T. Après une série de rinçages dans du PBS, les coupes incubent pendant 1 h (TA) en présence du complexe avidine-biotine-peroxydase (Kit Vectastain Elite ABC peroxydase standard, VPK-6100, Vector), dilué au 1/1000 dans du PBS. Ce complexe se fixe aux biotines non-saturées dans le tissu, celles conjuguées au peptide biotinylé. Ensuite, les étapes sont identiques à celles décrites précédemment.

### 9.3. *Annexe 3 : RT-PCR*

#### Mesure de l'expression des ARN cibles par RT calibrée et PCR quantitative

##### *1. Extraction des ARN totaux*

Les structures cérébrales congelées sont broyées à l'aide de pistons "RNase-Free", avant d'être homogénéisées dans 300µL d'eau ultra-pure (Eurobio) à l'issue de 3 cycles de congélation dans l'azote liquide/ décongélation. Une fraction aliquote de 150 µL de l'homogénat est prélevée pour le dosage ultérieur des protéines d'intérêts. L'extraction des ARN cibles se réalise en ajoutant 750 µL de Trizol LS (Euromedex) dans les 150 µL d'homogénat restant. Puis, l'addition de 200 µL de chloroforme suivie d'une centrifugation (15 min à 4°C; 12000g) permet d'isoler les acides nucléiques. Ceux-ci, situés dans la phase supérieure aqueuse, sont délicatement récupérés puis traités avec 500µL d'isopropanol (Sigma). Une nouvelle centrifugation (10 min à 4°C; 12000g) permet d'éliminer le surnageant et le culot d'acide nucléique est lavé dans 1,5 mL d'éthanol 75%. Enfin, après centrifugation (10 min à 4°C; 12000g) et élimination de l'éthanol, le culot d'ARN totaux est rapidement séché sur un bain chauffant à 37°C puis dissout dans 50 µL d'eau ultra-pure (Eurobio). Une fois mélangé, l'échantillon est congelé à -70°C.

##### *2. Purification des ARN totaux*

Une fois extraits, les ARN totaux sont traités à la Turbo DNA Free (Ambion) pendant 30 min à 37°C afin d'éliminer toute trace éventuelle d'ADN génomique. A l'issue de la purification, la concentration en ARN totaux est déterminée dans une Uvette exempte de RNAses (Eppendorf) par la mesure spectrophotométrique de la densité optique (DO) à 260 nm, sachant qu'une unité de DO équivaut à 40 µg/mL d'ARN.

##### *3. Vérification de l'absence de contamination en ADN génomique*

La vérification de non contamination en ADN génomique (ADNg) est réalisée sur 25 ng d'ARN totaux à partir de l'amplification d'une séquence du gène codant pour l'exon V du BDNF (rat). La PCR s'effectue sur Lightcycler<sup>TM</sup> (Roche) et comprend l'étape de dénaturation initiale, l'amplification sur 45 cycles, la courbe de fusion et le refroidissement. Le volume réactionnel contenu dans les capillaires comprend 5 µL de solution concentrée à 25 ng d'ARN totaux, et 5 µL de mélange réalisé à partir du kit Roche. Ce mélange Roche est élaboré à partir de 2,75 µL d'eau ultra-pure, 1 µL de Hot Start reaction mix (Roche), 1 µL de solution de MgCl<sub>2</sub> et 0,25 µL d'amorces spécifiques à la concentration de 10 µM chacune. Si une amplification est constatée à la suite de la PCR, cela signifie que la solution d'ARN est contaminé par de l'ADNg ; il devient alors nécessaire de re-purifier les divers échantillons.

Une fois que la vérification de non contamination de la solution d'ARN totaux (re)-purifiés est convaincante, l'étape de réaction de transcription inverse des ARN messager peut débuter.

#### *4. Réaction calibrée de transcription inverse des ARN messagers*

La méthode de calibration de la réaction de transcription inverse (RT) utilisée dans cette étude a fait l'objet d'un dépôt de brevet (Brevet International n°03290958.2 enregistré le 17 avril 2004 déposé aux noms du CNRS et de l'UCB Lyon 1 par les co-inventeurs Laurent BEZIN et Anne MORALES). Cette calibration est basée sur l'ajout d'une quantité connue d'un ARN de synthèse possédant une queue polyA (SmRNA) dans le volume réactionnel final de chaque échantillon où s'opère la RT. Cet ARN de synthèse joue le rôle de calibrateur externe hétérologue non-compétitif car: i) il possède une séquence nucléotidique distincte de toutes celles référencées dans les banques de données, tout génome confondu, et ii) la RT de cet ARN de synthèse n'interfère pas avec celles des ARN messagers endogènes des divers échantillons.

Afin de cibler essentiellement les ARN messagers contenus dans la solution d'ARN totaux, une amorce oligonucléotidique polyT20 est utilisée pendant la réaction de RT. Cette réaction se réalise sur un volume réactionnel de 20  $\mu\text{L}$ , contenant 12  $\mu\text{L}$  de solution d'ARN totaux purifiés ramenée à 41.7 ng/ $\mu\text{L}$ , et 8  $\mu\text{L}$  d'un pré-mélange réactionnel comprenant: 100 U/ $\mu\text{L}$  de M-MLV Reverse Transcriptase RNase H minus (Promega), le tampon de l'enzyme, 0.5mM de chacun des dNTPs (Promega), 1  $\mu\text{g}$  d'amorces polyT20 et 80 pg de SmRNA. Les RT de tous les échantillons correspondant à une même structure cérébrale, sont effectuées en même temps à partir d'un pré-mélange réactionnel identique. Après une incubation de 90 min à 40°C, la transcriptase inverse est inactivée par la chaleur (15 min à 70°C). Puis, les solutions d'ADN complémentaires (ADNc) obtenues pour chaque échantillon sont diluées dans 80  $\mu\text{L}$  d'eau ultra-pure (Eurobio) et fractionnées en aliquotes de 5  $\mu\text{L}$  dans des tubes à faible rétention (Axygen) avant d'être stockées à -25°C.

#### *5. Amplification quantitative des ADNc d'intérêt par PCR en "temps réel"*

Les séquences des couples d'amorces sens et anti-sens spécifiques ont été construites à l'aide du logiciel "Primer 3" (NIH; [www.basic.nwu.edu](http://www.basic.nwu.edu)). Les amorces sont ensuite synthétisées par Invitrogen (tableau 1).

#### *6. Principes et avantages de la PCR en "temps réel"*

L'amplification des ADNc d'intérêt est réalisée par la technique de PCR en "temps réel" à l'aide du Lightcycler™ (Roche). Le principal avantage de cette méthode est le suivi cycle par cycle de l'amplification, ce qui permet de déterminer précisément les cycles pour lesquels cette amplification est strictement exponentielle, et donc quantitative. Ce suivi est rendu

possible grâce à l'utilisation du fluophore SYBR Green I, qui n'est pas fluorescent sous sa forme libre, mais qui émet une fluorescence lorsqu'il est intercalé au niveau d'un ADN double-brin. Chaque cycle d'amplification comprend une phase de dénaturation, une phase d'hybridation des amorces et une phase d'élongation. A la fin de chaque cycle d'amplification, une lecture fluorimétrique est réalisée afin de quantifier avec une grande précision la quantité d'ADNc cibles amplifiés qui sont sous la forme double-brin. Le logiciel de traitement des données associé au Lightcycler permet d'identifier le "point de sortie" (PS) qui correspond au nombre de cycle théorique à partir duquel les ADNc peuvent être détectés dans la phase quantitative de l'amplification. La valeur du PS est inversement proportionnelle à la concentration initiale d'ADNc dans l'échantillon. Ainsi, la réalisation préalable d'une gamme d'étalonnage de la réaction de PCR pour chacun des ADNc d'intérêts permet de calculer, par extrapolation à partir du PS, la quantité d'ARN messenger d'intérêt dans les échantillons initiaux.

#### 7. Réalisation de la gamme étalon

Dans le but d'étalonner la réaction d'amplification, une gamme étalon est réalisée pour chaque gène sur une fenêtre de concentration en ADNc allant de 1 copie à 10<sup>8</sup> copies de telle sorte que leurs PS, après PCR en "temps réel", encadrent ceux des échantillons à doser. Ainsi, l'amplification des ADNc cibles contenus dans chaque point de la gamme permet d'obtenir une relation pour chaque gène entre le PS de l'échantillon et le nombre de copies d'ADNc ciblé présentes dans l'échantillon avant la PCR.

#### 8. Amplification des ADNc d'intérêt

Les conditions d'amplification par PCR en "temps réel" des ADNc d'intérêt sont présentées dans le tableau 2. Le volume réactionnel contenu dans un tube capillaire de PCR contient 15 µL de mélange réalisée à partir du kit Qiagen, pour le SmRNA, l'Epo, l'EpoR, l'IL-1β, le TNFα, la MCP-1, l'IL-6. Le mélange Qiagen est constitué de 4 µL d'eau ultra-pure (Eurobio), 10 µL de QuantiTect Master mix (Qiagen) et 1 µL d'amorces spécifiques à la concentration de 10 µM chacune. Les séquences des différentes paires d'amorces spécifiques utilisées ont été les suivantes :

Epo (GenBank NM\_017001)

forward 5' GCT CCA ATC TTT GTG GCA TC 3',  
reverse 5' ATC CAT GTC TTG CCC CCT A 3' (66 bp);

EpoR (GenBank D13566)

forward 5' CCA GCT CTA AGC TCC TGT GC 3',  
reverse 5' CTT CAG GTG AGG TGG AGT GG 3' (68 bp).

IL-1 $\beta$  (GenBank M98820.1),

forward 5' GCA CCT TCT TTT CCT TCA TCT,

reverse 3' CCG CTT TTC CAT CTT CTT CTT, 374pb ;

TNF $\alpha$  (GenBank X66539.1),

forward 5' CAA ACC ACC AAG CAG AGG AG,

reverse 3' GTG AGG AGC ACA TAG TCG GG, 175 pb ;

MCP-1 (GenBank M57441.1)

forward 5' CGG CTG GAG AAC TAC AAG AGA,

reverse 3' TCT CTT GAG CTT GGT GAC AAA TA, 78pb.

IL-6 (GenBank NM\_012589.1)

forward 5' TAC CAC CCA CAA CAG ACC A,

reverse 3' TCC AGA AGA CCA GAG CAG A, 243 pb ;

#### 9.4. *Acquisition des données en IRM*

Animals were anesthetized for MRI scans with an approved system (TEM Sega, Lormont, France) using 3% isoflurane with a flow of 0.6 l/min air with 30% oxygen.

After anesthesia induction, anesthesia was maintained with isoflurane gas at 1.5 to 2.5%.

Rat were placed in a prone position on a plexiglass bed (Bruker Biospec Animal Handling Systems) equipped with stereotactic fixation (tooth bar and ear pins) and an integrated warm water bed. Breathing rate was monitored throughout the experiment.

Magnetic resonance imaging was performed in a 7 Tesla Biospec System (Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Germany) equipped with a high strength gradient system (400mT/m maximum amplitude). A birdcage coil of 72 mm inner diameter (Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Germany) was used for both emission and signal reception. In order to increase signal-to-noise ratio, an actively decoupled surface coil (25 mm diameter) was positioned on the head of the animal for signal reception.

A quick gradient echo localiser (FLASH) sequence with three orthogonal orientations and a 6 cm field of view was first used to identify the region of interest (brain) and allowe calculation of fixed spatial coordinates for following scans.

Then, T2-weighted contrast images were acquired in the axial plane based rapid acquisition with relaxation enhanced (RARE) sequence with a Fat Saturation (FatSat) motif included. The acquisition characteristics were as follow: Repetition time (TR) 3500 ms, echo time (TE) 60 ms, RARE factor = 8 and a 5 min scan time ; a total of 25 slices (slice thickness 0.8 mm)

was acquired with a field of view (FOV) of 2.56 x 2.56 cm<sup>2</sup>, matrix 256 x 256, resulting in a resolution 100 x 100 x 800  $\mu\text{m}^3$ .

A Diffusion Tensor Imaging (DTI) Echo Planar Imaging (EPI) sequence was used to acquire coronal plane images with the following characteristics: Spin Echo mode, TR=3750ms, TE=26ms, slice thickness of 0.8mm, Fat Saturation, single shot acquisition of a 128x128 pixels matrix of 25 slices. FOV of 2.56x2.56 cm, resulting in a resolution of 200 x 200 x 800  $\mu\text{m}^3$ . To acquire diffusion information, the diffusion experiment parameters were: B value = 1000s/mm<sup>2</sup> applied along 30 different directions, diffusion gradient duration  $\delta = 5\text{ms}$ , diffusion gradient separation  $\Delta = 12\text{ms}$ . Four dummy scan were applied prior each acquisition to provide a dynamic equilibrium to the magnetization. The diffusion tensor images were reconstructed using the manufacturer's software and analyzed using the ImageJ software provided by the US National Institute of Health.

Mathematical processes were presented below.

## Diffusion in MRI

Brownian, motion of water is a random process but the motion of these water molecules is usually restricted. In tissues this restriction can be due to intracellular boundaries and also to extracellular boundaries. Diffusion of water molecules can to a certain amount characterize the tissues and also their healthiness.

The main characteristic of diffusion is to create a mean square displacement  $\langle r^2 \rangle$  of the water, this mean square displacement is a function of the time allowed for the diffusion to take place and also of an Apparent Diffusion Coefficient (ADC)  $D$  ( $[m]^2[s]^{-1}$ )

Einstein demonstrated the relationship between  $D$  and  $\langle r^2 \rangle$ :

$$\langle r^2 \rangle = 2Dt$$

Diffusion being a tri-dimensionnal process the means square displacements can be studied along all three dimensions giving rise to corresponding ADC coefficients. These coefficients can be expressed in tensorial form:

$$\mathbf{D} = \begin{bmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{yx} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{zx} & D_{zy} & D_{zz} \end{bmatrix}$$

In free water the diffusion is isotropic and the ADC value is approximately equal to  $2.10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ .

### Diffusion encoding in MRI

In MRI Image acquisition relies on the ability to acquire the phase and frequency of the magnetization. This is done via the application of magnetic gradients, applied along given dimension. This technique is also used to encode the diffusion information:

Lets consider a gradient  $G$  applied along the dimension  $x$  (chosen arbitrarily).

Along this direction the frequency of the magnetization becomes a linear function of position:

$$v = Gx$$

and the phase will be:

$$\phi(t) = \int^{Evolution\ time} Gx \, dt$$

if we choose to apply a gradient during a given time  $t_{evol}$  and it's opposite during the same time we have:

$$\phi(t) = \int^{Evolution\ time} Gx \, dt - \int^{Evolution\ time} Gx \, dt$$

When we consider unmoving water ( $x$  constant over time)

$$\phi(2\ Evolution\ time) = 0$$

And if we consider water moving from  $dx$  along the  $x$  direction:

$$\phi(2\ Evolution\ time) \propto dx$$

The phase of the signal is proportional to the mean displacement.

Torrey (1956) and Stejskal (1965) have demonstrated that the MR signal intensity is a function of the diffusion coefficient:

$$S = S_0 e^{-bD}$$

$S_0$  is the signal without diffusion,  $b$  is the diffusion encoding parameter. This second parameter depends on the gradient intensity and duration and can be chosen by the operator. low  $b$  values produces a small dephasing and thus a small signal decrease. Small  $b$  values are used to track high speed diffusion or even perfusion in tissues.

High  $b$  values are used for small diffusion detection.

Typical diffusion coefficient  $D$  in body tissues ranges  $1-10.10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$  and thus,  $b$  values runs typically

from 100 to a few 1000 of s/mm<sup>2</sup>

### Diffusion measurement

To quantify  $D$  along a given direction we need at least two acquisitions with two different values for  $b$ :

$$D = \frac{-1}{b_2 - b_1} \log \left( \frac{S(b_2)}{S(b_1)} \right)$$

The measure of  $D$  along the direction  $x, y$  and  $z$  (diagonal coefficients of the diffusion tensor) is sufficient to characterize the mean diffusivity of a tissue (ADC) and also a ratio constructed to measure the anisotropy of diffusion (Fractional Anisotropy FA):

$$ADC_m = \frac{D_{xx} + D_{yy} + D_{zz}}{3}$$

and

$$FA = \sqrt{\frac{3}{2}} \sqrt{\frac{(D_{xx} - ADC_m)^2 + (D_{yy} - ADC_m)^2 + (D_{zz} - ADC_m)^2}{D_{xx}^2 + D_{yy}^2 + D_{zz}^2}}$$

For isotropic diffusion  $FA = 0$  and for very anisotropic diffusion,  $FA$  tend to 1.

Anisotropy can also be expressed and subdivided in three terms: the linear, planar and spherical fractions.

By setting arbitrarily  $D_{xx} \geq D_{yy} \geq D_{zz} \geq 0$  we have:

In the case of  $D_{xx} \gg D_{yy} \approx D_{zz}$  (linear case) where the diffusivity along the main direction is very superior to the diffusivity along the other directions (diffusivity cigar shaped):

$$C_l = \frac{D_{xx} - D_{yy}}{D_{xx} + D_{yy} + D_{zz}}$$

In the case of  $D_{xx} \approx D_{yy} \gg D_{zz}$  (planar case) where the diffusivity occur mainly in a plane (plate shaped)

$$C_p = 2 \frac{D_{yy} - D_{zz}}{D_{xx} + D_{yy} + D_{zz}}$$

In the case of  $D_{xx} \approx D_{yy} \approx D_{zz}$  (spherical case) where the diffusivity is globally isotropic (spherically shaped)

$$C_s = 3 \frac{D_{zz}}{D_{xx} + D_{yy} + D_{zz}}$$

Each of these measures lies between 0 and 1 and their sum is 1.

Another anisotropy measure is also sometime defined to measure the deviation from the spherical case:

$$C_a = 1 - C_s$$

These coefficients are used as complements to the notion of fractional anisotropy by giving additional informations about the global shape of the diffusivity in tissues.

## 10. BIBLIOGRAPHIE

---

- **A**IS 1990; Association for the Advancement of Automotive Medicine. (1990). The Abbreviated Injury Scale, 1990 Revision. Des Plaines, IL: Association for the Advancement of Automotive Medicine.
- Alafaci C, Salpietro F, Grasso G, Sfacteria A, Passalacqua M, Morabito A, Tripodo E, Calapai G, Buemi M, Tomasello F. Effect of recombinant human erythropoietin on cerebral ischemia following experimental subarachnoid hemorrhage. *Eur J Pharmacol.* 2000 Oct 13;406(2):219-25.
- Aldrich EF, Eisenberg HM, Saydjari C, Luerssen TG, Foulkes MA, Jane JA, Marshall LF, Marmarou A, Young HF. Diffuse brain swelling in severely head-injured children. A report from the NIH Traumatic Coma Data Bank. *J Neurosurg.* 1992 Mar;76(3):450-4.
- Alexander AL, Lee JE, Lazar M, Field AS. Diffusion tensor imaging of the brain. *Neurotherapeutics.* 2007 Jul;4(3):316-29.
- Ambrosini E, Aloisi F. Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system. *Neurochem Res.* 2004 May;29(5):1017-38.
- Andelic N, Sigurdardottir S, Brunborg C, Roe C. Incidence of hospital-treated traumatic brain injury in the Oslo population. *Neuroepidemiology.* 2008;30(2):120-8.
- Anderson KJ, Fugaccia I, Scheff SW. Fluoro-jade B stains quiescent and reactive astrocytes in the rodent spinal cord. *J Neurotrauma.* 2003 Nov;20(11):1223-31.
- Anderson KJ, Miller KM, Fugaccia I, Scheff SW. Regional distribution of fluoro-jade B staining in the hippocampus following traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2005 May;193(1):125-30.
- **B**endlin BB, Ries ML, Lazar M, Alexander AL, Dempsey RJ, Rowley HA, Sherman JE, Johnson SC. Longitudinal changes in patients with traumatic brain injury assessed with diffusion-tensor and volumetric imaging. *Neuroimage.* 2008 Aug 15;42(2):503-14.
- Benraiss A, Chmielnicki E, Lerner K, Roh D, Goldman SA. Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci.* 2001 Sep 1;21(17):6718-31.
- Bergeron M, Yu AY, Solway KE, Semenza GL, Sharp FR. Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain. *Eur J Neurosci.* 1999 Dec;11(12):4159-70.
- Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, Yvon A, Vivien D, Duchatelle I, Mackenzie ET, Petit E. Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia.* 2000 May;30(3):271-8.
- Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999 Jun;19(6):643-51.
- Bernaudin M, Nedelec AS, Divoux D, MacKenzie ET, Petit E, Schumann-Bard P. Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002 Apr;22(4):393-403.
- Besson VC, Croci N, Boulu RG, Plotkine M, Marchand-Verrecchia C. Deleterious poly(ADP-ribose)polymerase-1 pathway activation in traumatic brain injury in rat. *Brain Res.* 2003 Oct 31;989(1):58-66.
- Blondeau N, Widmann C, Lazdunski M, Heurteaux C. Activation of the nuclear factor-kappaB is a key event in brain tolerance. *J Neurosci.* 2001 Jul 1;21(13):4668-77.
- Bohlius J, Wilson J, Seidenfeld J, Piper M, Schwarzer G, Sandercock J, Trelle S, Weingart O, Bayliss S, Brunskill S, Djulbegovic B, Bennett CL, Langensiepen S, Hyde C, Engert E. Erythropoietin or darbepoetin for patients with cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006 Jul 19;3:CD003407.
- Bohlius J, Wilson J, Seidenfeld J, Piper M, Schwarzer G, Sandercock J, Trelle S, Weingart O, Bayliss S, Djulbegovic B, Bennett CL, Langensiepen S, Hyde C, Engert A. Recombinant human erythropoietins and

cancer patients: updated meta-analysis of 57 studies including 9353 patients. *J Natl Cancer Inst.* 2006 May 17;98(10):708-14.

- Bosche B, Graf R, Ernestus RI, Dohmen C, Reithmeier T, Brinker G, Strong AJ, Dreier JP, Woitzik J; Members of the Cooperative Study of Brain Injury Depolarizations (COSBID). Recurrent spreading depolarizations after subarachnoid hemorrhage decreases oxygen availability in human cerebral cortex. *Ann Neurol.* 2010 May;67(5):607-17.
- Bouet V, Boulouard M, Toutain J, Divoux D, Bernaudin M, Schumann-Bard P, Freret T. The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. *Nat Protoc.* 2009;4(10):1560-4.
- Bouzat P, Francony G, Thomas S, Valable S, Mauconduit F, Fevre MC, Barbier EL, Bernaudin M, Lahrech H, Payen JF. Reduced brain edema and functional deficits after treatment of diffuse traumatic brain injury by carbamylated erythropoietin derivative. *Crit Care Med.* 2011 Sep;39(9):2099-105.
- Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin DS, Eisenberg HM, Flamm E, Leo-Summers L, Maroon J, et al. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl J Med.* 1990 May 17;322(20):1405-11.
- Bratton SL, Chestnut RM, Ghajar J, McConnell Hammond FF, Harris OA, Hartl R, Manley GT, Nemecek A, Newell DW, Rosenthal G, Schouten J, Shutter L, Timmons SD, Ullman JS, Videtta W, Wilberger JE, Wright DW. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. VI. Indications for intracranial pressure monitoring. *J Neurotrauma.* 2007;24 Suppl 1:S37-44.
- Bratton SL, Chestnut RM, Ghajar J, McConnell Hammond FF, Harris OA, Hartl R, Manley GT, Nemecek A, Newell DW, Rosenthal G, Schouten J, Shutter L, Timmons SD, Ullman JS, Videtta W, Wilberger JE, Wright DW. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. XIII. Antiseizure prophylaxis. *J Neurotrauma.* 2007;24 Suppl 1:S83-6.
- Bratton SL, Chestnut RM, Ghajar J, McConnell Hammond FF, Harris OA, Hartl R, Manley GT, Nemecek A, Newell DW, Rosenthal G, Schouten J, Shutter L, Timmons SD, Ullman JS, Videtta W, Wilberger JE, Wright DW. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. I. Blood pressure and oxygenation. *J Neurotrauma.* 2007;24 Suppl 1:S7-13.
- Bratton SL, Chestnut RM, Ghajar J, McConnell Hammond FF, Harris OA, Hartl R, Manley GT, Nemecek A, Newell DW, Rosenthal G, Schouten J, Shutter L, Timmons SD, Ullman JS, Videtta W, Wilberger JE, Wright DW. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. IX. Cerebral perfusion thresholds. *J Neurotrauma.* 2007;24 Suppl 1:S59-64. No abstract available. Erratum in: *J Neurotrauma.* 2008 Mar;25(3):276-8.
- Bratton SL, Chestnut RM, Ghajar J, McConnell Hammond FF, Harris OA, Hartl R, Manley GT, Nemecek A, Newell DW, Rosenthal G, Schouten J, Shutter L, Timmons SD, Ullman JS, Videtta W, Wilberger JE, Wright DW. VIII. Intracranial pressure thresholds. in *Guidelines for the management of severe traumatic brain injury 2007*
- Bredesen DE, Rao RV, Mehlen P. Cell death in the nervous system. *Nature.* 2006 Oct 19;443(7113):796-802.
- Brenner LA, Ivins BJ, Schwab K, Warden D, Nelson LA, Jaffee M, Terrio H. Traumatic brain injury, posttraumatic stress disorder, and postconcussive symptom reporting among troops returning from Iraq. *J Head Trauma Rehabil.* 2010 Sep-Oct;25(5):307-12.
- Bretschneider J, Widl K, Ehrenreich H, Riepe M, Tumani H. Erythropoietin in the cerebrospinal fluid in neurodegenerative diseases. *Neurosci Lett.* 2006 Sep 1;404(3):347-51.
- Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Sep 12;97(19):10526-31.
- Broomhall LG, Clark CR, McFarlane AC, O'Donnell M, Bryant R, Creamer M, Silove D. Early stage assessment and course of acute stress disorder after mild traumatic brain injury. *J Nerv Ment Dis.* 2009 Mar;197(3):178-81.
- Bryant RA. Disentangling mild traumatic brain injury and stress reactions. *N Engl J Med.* 2008 Jan 31;358(5):525-7.

- Buemi M, Grasso G, Corica F, Calapai G, Salpietro FM, Casuscelli T, Sfacteria A, Aloisi C, Alafaci C, Sturiale A, Frisina N, Tomasello F. In vivo evidence that erythropoietin has a neuroprotective effect during subarachnoid hemorrhage. *Eur J Pharmacol.* 2000 Mar 24;392(1-2):31-4.
- Bye N, Carron S, Han X, Agyapomaa D, Ng SY, Yan E, Rosenfeld JV, Morganti-Kossmann MC. Neurogenesis and glial proliferation are stimulated following diffuse traumatic brain injury in adult rats. *J Neurosci Res.* 2011 Jul;89(7):986-1000.
- Caeyenberghs K, Leemans A, Coxon J, Leunissen I, Drijkoningen D, Geurts M, Gooijers J, Michiels K, Sunaert S, Swinnen SP. Bimanual coordination and corpus callosum microstructure in young adults with traumatic brain injury: a diffusion tensor imaging study. *J Neurotrauma.* 2011 Jun;28(6):897-913.
- Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005;29(8):1193-205.
- Cernak I, Chapman SM, Hamlin GP, Vink R. Temporal characterisation of pro- and anti-apoptotic mechanisms following diffuse traumatic brain injury in rats. *J Clin Neurosci.* 2002 Sep;9(5):565-72.
- Chanraud S, Zahr N, Sullivan EV, Pfefferbaum A. MR diffusion tensor imaging: a window into white matter integrity of the working brain. *Neuropsychol Rev.* 2010 Jun;20(2):209-25.
- Chen ZY, Warin R, Noguchi CT. Erythropoietin and normal brain development: receptor expression determines multi-tissue response. *Neurodegener Dis.* 2006;3(1-2):68-75.
- Cherian L, Goodman JC, Robertson C. Neuroprotection with erythropoietin administration following controlled cortical impact injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007 Aug;322(2):789-94.
- Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Apaf-1, Bcl-xL, cytochrome c, and caspase-9 form the critical elements for cerebral vascular protection by erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003 Mar;23(3):320-30.
- Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin fosters both intrinsic and extrinsic neuronal protection through modulation of microglia, Akt1, Bad, and caspase-mediated pathways. *Br J Pharmacol.* 2003 ;138(6):1107-18.
- Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. *Circulation.* 2002 Dec 3;106(23):2973-9.
- Chong ZZ, Li F, Maiese K. Erythropoietin requires NF-kappaB and its nuclear translocation to prevent early and late apoptotic neuronal injury during beta-amyloid toxicity. *Curr Neurovasc Res.* 2005 Dec;2(5):387-99.
- Chong ZZ, Lin SH, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin prevents early and late neuronal demise through modulation of Akt1 and induction of caspase 1, 3, and 8. *J Neurosci Res.* 2003 Mar 1;71(5):659-69.
- Chong ZZ, Maiese K. Erythropoietin involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway, 14-3-3 protein and FOXO3a nuclear trafficking to preserve endothelial cell integrity. *Br J Pharmacol.* 2007 Apr;150(7):839-50. Epub 2007 Mar 5.
- Christidi F, Bigler ED, McCauley SR, Schnelle KP, Merkley TL, Mors MB, Li X, Macleod M, Chu Z, Hunter JV, Levin HS, Clifton GL, Wilde EA. Diffusion tensor imaging of the perforant pathway zone and its relation to memory function in patients with severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2011 May;28(5):711-25.
- Ciallella JR, Ikonovic MD, Paljug WR, Wilbur YI, Dixon CE, Kochanek PM, Marion DW, DeKosky ST. Changes in expression of amyloid precursor protein and interleukin-1beta after experimental traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma.* 2002 Dec;19(12):1555-67.
- Cibelli M, Fidalgo AR, Terrando N, Ma D, Monaco C, Feldmann M, Takata M, Lever IJ, Nanchahal J, Fanselow MS, Maze M. Role of interleukin-1beta in postoperative cognitive dysfunction. *Ann Neurol.* 2010 Sep;68(3):360-8.
- Cody J, Daly C, Campbell M, Donaldson C, Khan I, Rabindranath K, Vale L, Wallace S, Macleod A. Recombinant human erythropoietin for chronic renal failure anaemia in pre-dialysis patients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005 Jul 20;(3):CD003266.
- Cody J, Daly C, Campbell M, Donaldson C, Khan I, Vale L, Wallace S, Macleod A. Frequency of administration of recombinant human erythropoietin for anaemia of end-stage renal disease in dialysis patients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005 Jul 20;(3):CD003895.
- Coleman MR, Davis MH, Rodd JM, Robson T, Ali A, Owen AM, Pickard JD. Towards the routine use of brain imaging to aid the clinical diagnosis of disorders of consciousness. *Brain.* 2009 Sep;132(Pt 9):2541-52.

- Coleman TR, Westenfelder C, Tšgel FE, Yang Y, Hu Z, Swenson L, Leuvenink HG, Ploeg RJ, d'Uscio LV, Katusic ZS, Ghezzi P, Zanetti A, Kaushansky K, Fox NE, Cerami A, Brines M. Cytoprotective doses of erythropoietin or carbamylated erythropoietin have markedly different procoagulant and vasoactive activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Apr 11;103(15):5965-70.
- Coleman MR, Davis MH, Rodd JM, Robson T, Ali A, Owen AM, Pickard JD. Towards the routine use of brain imaging to aid the clinical diagnosis of disorders of consciousness. *Brain*. 2009 Sep;132(Pt 9):2541-52
- Cook D, Crowther M. Targeting anemia with erythropoietin during critical illness. *N Engl J Med*. 2007 Sep 6;357(10):1037-9.
- Cooper DJ, Rosenfeld JV, Murray L, Arabi YM, Davies AR, D'Urso P, Kossmann T, Ponsford J, Seppelt I, Reilly P, Wolfe R; DECRA Trial Investigators; Australian and New Zealand Intensive Care Society Clinical Trials Group. Decompressive craniectomy in diffuse traumatic brain injury. *N Engl J Med*. 2011 Apr 21;364(16):1493-502.
- Cooper DJ, Rosenfeld JV. Does decompressive craniectomy improve outcomes in patients with diffuse traumatic brain injury? *Med J Aust*. 2011 May 2;194(9):437-8.
- Cortez SC, McIntosh TK, Noble LJ. Experimental fluid percussion brain injury: vascular disruption and neuronal and glial alterations. *Brain Res*. 1989 Mar 20;482(2):271-82.
- Corwin HL, Gettinger A, Fabian TC, May A, Pearl RG, Heard S, An R, Bowers PJ, Burton P, Klausner MA, Corwin MJ; EPO Critical Care Trials Group. Efficacy and safety of epoetin alfa in critically ill patients. *N Engl J Med*. 2007 Sep 6;357(10):965-76.
- Corwin HL, Gettinger A, Pearl RG, Fink MP, Levy MM, Shapiro MJ, Corwin MJ, Colton T; EPO Critical Care Trials Group. Efficacy of recombinant human erythropoietin in critically ill patients: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2002 Dec 11;288(22):2827-35.
- Corwin HL, Gettinger A, Rodriguez RM, Pearl RG, Gubler KD, Enny C, Colton T, Corwin MJ. Efficacy of recombinant human erythropoietin in the critically ill patient: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Crit Care Med*. 1999 Nov;27(11):2346-50.
- Dame C, Juul SE, Christensen RD. The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential. *Biol Neonate*. 2001;79(3-4):228-35.
- Didier N, Romero IA, Créminon C, Wijkhuisen A, Grassi J, Mabondzo A. Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. *J Neurochem*. 2003 Jul;86(1):246-54.
- Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Bauer C, Gassmann M. Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Apr 25;92(9):3717-20.
- Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature*. 2001 Aug 9;412(6847):641-7.
- Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghmai AA, Hayes RL. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods*. 1991 Oct;39(3):253-62.
- Dixon CE, Lighthall JW, Anderson TE. Physiologic, histopathologic, and cineradiographic characterization of a new fluid-percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurotrauma*. 1988;5(2):91-104.
- Dixon CE, Lyeth BG, Povlishock JT, Findling RL, Hamm RJ, Marmarou A, Young HF, Hayes RL. A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurosurg*. 1987 Jul;67(1):110-9.
- Dong GX, Singh DK, Dendle P, Prasad RM. Regional expression of Bcl-2 mRNA and mitochondrial cytochrome c release after experimental brain injury in the rat. *Brain Res*. 2001 Jun 8;903(1-2):45-52.
- Dreier JP, Major S, Manning A, Woitzik J, Drenckhahn C, Steinbrink J, Tolia C, Oliveira-Ferreira AI, Fabricius M, Hartings JA, Vajkoczy P, Lauritzen M, Dirnagl U, Bohner G, Strong AJ; COSBID study group. Cortical spreading ischaemia is a novel process involved in ischaemic damage in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Brain*. 2009 Jul;132(Pt 7):1866-81.
- Dreier JP, Woitzik J, Fabricius M, Bhatia R, Major S, Drenckhahn C, Lehmann TN, Sarrafzadeh A, Willumsen L, Hartings JA, Sakowitz OW, Seemann JH, Thieme A, Lauritzen M, Strong AJ. Delayed

ischaemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depolarizations. *Brain*. 2006 Dec;129(Pt 12):3224-37.

- Dreier JP. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat Med*. 2011 Apr;17(4):439-47.
- Dubreuil CI, Marklund N, Deschamps K, McIntosh TK, McKerracher L. Activation of Rho after traumatic brain injury and seizure in rats. *Exp Neurol*. 2006 Apr;198(2):361-9.
- Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, Rhyth E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Siržn AL. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med*. 2002 Aug;8(8):495-505.
- Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H, Schneider D, Weimar C, Wartenberg K, Schellinger PD, Bohn M, Becker H, Wegryn M, Jähnig P, Herrmann M, Knauth M, Bähr M, Heide W, Wagner A, Schwab S, Reichmann H, Schwendemann G, Dengler R, Kastrup A, Bartels C; EPO Stroke Trial Group. Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke*. 2009 Dec;40(12):e647-56
- Engberg Aa W, Teasdale TW. Traumatic brain injury in Denmark 1979-1996. A national study of incidence and mortality. *Eur J Epidemiol*. 2001;17(5):437-42.
- Engberg AW, Teasdale TW. Psychosocial outcome following traumatic brain injury in adults: a long-term population-based follow-up. *Brain Inj*. 2004 Jun;18(6):533-45.
- Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, Torup L, Sager T, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Ghezzi P, Villa P, Fratelli M, Casagrande S, Leist M, Helboe L, Gerwein J, Christensen S, Geist MA, Pedersen LØ, Cerami-Hand C, Wuerth JP, Cerami A, Brines M. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 27;100(11):6741-6.
- Fabricius M, Fuhr S, Willumsen L, Dreier JP, Bhatia R, Boutelle MG, Hartings JA, Bullock R, Strong AJ, Lauritzen M. Association of seizures with cortical spreading depression and peri-infarct depolarisations in the acutely injured human brain. *Clin Neurophysiol*. 2008 Sep;119(9):1973-84.
- Fan X, Heijnen CJ, van der KOOIJ MA, Groenendaal F, van Bel F. Beneficial effect of erythropoietin on sensorimotor function and white matter after hypoxia-ischemia in neonatal mice. *Pediatr Res*. 2011 Jan;69(1):56-61.
- Fan X, Heijnen CJ, van der Kooij MA, Groenendaal F, van Bel F. The role and regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha expression in brain development and neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Res Rev*. 2009 Dec 11;62(1):99-108.
- Ferrario M, Arbustini E, Massa M, Rosti V, Marziliano N, Raineri C, Campanelli R, Bertolotti A, De Ferrari GM, Klersy C, Angoli L, Bramucci E, Marinoni B, Ferlini M, Moretti E, Raisaro A, Repetto A, Schwartz PJ, Tavazzi L. High-dose erythropoietin in patients with acute myocardial infarction: a pilot, randomised, placebo-controlled study. *Int J Cardiol*. 2011 Feb 17;147(1):124-31.
- Figueroa YG, Chan AK, Ibrahim R, Tang Y, Burow ME, Alam J, Scandurro AB, Beckman BS. NF-kappaB plays a key role in hypoxia-inducible factor-1-regulated erythropoietin gene expression. *Exp Hematol*. 2002 Dec;30(12):1419-27.
- Foda MA, Marmarou A. A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg*. 1994 Feb;80(2):301-13.
- Fujimoto ST, Longhi L, Saatman KE, Conte V, Stocchetti N, McIntosh TK. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004 Jul;28(4):365-78.
- Fumagalli F, Madaschi L, Brenna P, Caffino L, Marfia G, Di Giulio AM, Racagni G, Gorio A. Single exposure to erythropoietin modulates Nerve Growth Factor expression in the spinal cord following traumatic injury: comparison with methylprednisolone. *Eur J Pharmacol*. 2008 Jan 6;578(1):19-27.
- Gabrielian L, Willshire LW, Helps SC, van den Heuvel C, Mathias J, Vink R. Intracranial pressure changes following traumatic brain injury in rats: lack of significant change in the absence of mass lesions or hypoxia. *J Neurotrauma*. 2011 Oct;28(10):2103-11.

- Geeraerts T, Friggeri A, Mazoit JX, Benhamou D, Duranteau J, Vigué B. Posttraumatic brain vulnerability to hypoxia-hypotension: the importance of the delay between brain trauma and secondary insult. *Intensive Care Med.* 2008 Mar;34(3):551-60.
- Geeraerts T, Newcombe VF, Coles JP, Abate MG, Perkes IE, Hutchinson PJ, Outtrim JG, Chatfield DA, Menon DK. Use of T2-weighted magnetic resonance imaging of the optic nerve sheath to detect raised intracranial pressure. *Crit Care.* 2008;12(5):R114.
- Geeraerts T, Ract C, Tardieu M, Fourcade O, Mazoit JX, Benhamou D, Duranteau J, Vigué B. Changes in cerebral energy metabolites induced by impact-acceleration brain trauma and hypoxic-hypotensive injury in rats. *J Neurotrauma.* 2006 Jul;23(7):1059-71.
- Goldman SA, Nedergaard M. Erythropoietin strikes a new cord. *Nature Med.* 2002, 8, 285-7.
- Goodnough LT, Maniatis A, Earnshaw P, Benoni G, Beris P, Bisbe E, Fergusson DA, Gombotz H, Habler O, Monk TG, Ozier Y, Slappendel R, Szpalski M. Detection, evaluation, and management of preoperative anaemia in the elective orthopaedic surgical patient: NATA guidelines. *Br J Anaesth.* 2011 Jan;106(1):13-22.
- Goodnough LT, Nemeth E, Ganz T. Detection, evaluation, and management of iron-restricted erythropoiesis. *Blood.* 2010 Dec 2;116(23):4754-61.
- Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S, Yilmaz O, Madaschi L, Cichetti C, Di Giulio AM, Vardar E, Cerami A, Brines M. Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jul 9;99(14):9450-5.
- Gorio A, Madaschi L, Di Stefano B, Carelli S, Di Giulio AM, De Biasi S, Coleman T, Cerami A, Brines M. Methylprednisolone neutralizes the beneficial effects of erythropoietin in experimental spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov 8;102(45):16379-84.
- Grady MS, Charleston JS, Maris D, Witgen BM, Lifshitz J. Neuronal and glial cell number in the hippocampus after experimental traumatic brain injury: analysis by stereological estimation. *J Neurotrauma.* 2003 Oct;20(10):929-41.
- Grasso G, Graziano F, Sfacteria A, Carletti F, Meli F, Maugeri R, Passalacqua M, Certo F, Fazio M, Buemi M, Iacopino DG. Neuroprotective effect of erythropoietin and darbepoetin alfa after experimental intracerebral hemorrhage. *Neurosurgery.* 2009 Oct;65(4):763-9.
- Grasso G, Sfacteria A, Erbayraktar S, Passalacqua M, Meli F, Gokmen N, Yilmaz O, La Torre D, Buemi M, Iacopino DG, Coleman T, Cerami A, Brines M, Tomasello F. Amelioration of spinal cord compressive injury by pharmacological preconditioning with erythropoietin and a nonerythropoietic erythropoietin derivative. *J Neurosurg Spine.* 2006 Apr;4(4):310-8.
- Grasso G, Sfacteria A, Meli F, Fodale V, Buemi M, Iacopino DG. Neuroprotection by erythropoietin administration after experimental traumatic brain injury. *Brain Res.* 2007 Nov 28;1182:99-105.
- Grasso G, Sfacteria A, Passalacqua M, Morabito A, Buemi M, Macri B, Brines ML, Tomasello F. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression after experimental spinal cord injury encourages therapy by exogenous erythropoietin. *Neurosurgery.* 2005 Apr;56(4):821-7.
- Gunnarson E, Song Y, Kowalewski JM, Brismar H, Brines M, Cerami A, Andersson U, Zelenina M, Aperia A. Erythropoietin modulation of astrocyte water permeability as a component of neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Feb 3;106(5):1602-7. Epub 2009 Jan 21.
- Gurkoff GG, Giza CC, Hovda DA. Lateral fluid percussion injury in the developing rat causes an acute, mild behavioral dysfunction in the absence of significant cell death. *Brain Res.* 2006 Mar 10;1077(1):24-36.
- Hartings JA, Bullock MR, Okonkwo DO, Murray LS, Murray GD, Fabricius M, Maas AI, Woitzik J, Sakowitz O, Mathern B, Roozenbeek B, Lingsma H, Dreier JP, Puccio AM, Shutter LA, Pahl C, Strong AJ; for the Co-Operative Study on Brain Injury Depolarisations. Spreading depolarisations and outcome after traumatic brain injury: a prospective observational study. *Lancet Neurol.* 2011 Dec;10(12):1058-1064.
- Hartings JA, Strong AJ, Fabricius M, Manning A, Bhatia R, Dreier JP, Mazzeo AT, Tortella FC, Bullock MR; Co-Operative Study of Brain Injury Depolarizations. Spreading depolarizations and late secondary insults after traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2009 Nov;26(11):1857-66.

- Hartings JA, Watanabe T, Bullock MR, Okonkwo DO, Fabricius M, Woitzik J, Dreier JP, Puccio A, Shutter LA, Pahl C, Strong AJ; Co-Operative Study on Brain Injury Depolarizations. Spreading depolarizations have prolonged direct current shifts and are associated with poor outcome in brain trauma. *Brain*. 2011 May;134(Pt 5):1529-40.
- Harvey AG, Bryant RA. Two-year prospective evaluation of the relationship between acute stress disorder and posttraumatic stress disorder following mild traumatic brain injury. *Am J Psychiatry*. 2000 Apr;157(4):626-8.
- Hellmich HL, Capra B, Eidson K, Garcia J, Kennedy D, Uchida T, Parsley M, Cowart J, DeWitt DS, Prough DS. Dose-dependent neuronal injury after traumatic brain injury. *Brain Res*. 2005 May 24;1044(2):144-54.
- Hellmich HL, Eidson KA, Capra BA, Garcia JM, Boone DR, Hawkins BE, Uchida T, Dewitt DS, Prough DS. Injured Fluoro-Jade-positive hippocampal neurons contain high levels of zinc after traumatic brain injury. *Brain Res*. 2007 Jan 5;1127(1):119-26.
- Heskestad B, Waterloo K, Baardsen R, Helseth E, Romner B, Ingebrigtsen T. No impact of early intervention on late outcome after minimal, mild and moderate head injury. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2010 Feb 24;18:10.
- Hicks R, Soares H, Smith D, McIntosh T. Temporal and spatial characterization of neuronal injury following lateral fluid-percussion brain injury in the rat. *Acta Neuropathol*. 1996;91(3):236-46.
- Hicks RR, Smith DH, Lowenstein DH, Saint Marie R, McIntosh TK. Mild experimental brain injury in the rat induces cognitive deficits associated with regional neuronal loss in the hippocampus. *J Neurotrauma*. 1993 Winter;10(4):405-14.
- Hillman J, Aneman O, Persson M, Andersson C, Dabrosin C, Mellergård P. Variations in the response of interleukins in neurosurgical intensive care patients monitored using intracerebral microdialysis. *J Neurosurg*. 2007 May;106(5):820-5.
- Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, Mohamed M, Chaudhuri AR, Zalutsky R. How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology*. 2007 Jan 30;68(5):326-37.
- Hoge CW, McGurk D, Thomas JL, Cox AL, Engel CC, Castro CA. Mild traumatic brain injury in U.S. Soldiers returning from Iraq. *N Engl J Med*. 2008 Jan 31;358(5):453-63.
- Hogg S, Moser PC, Sanger DJ. Mild traumatic lesion of the right parietal cortex of the rat: selective behavioural deficits in the absence of neurological impairment. *Behav Brain Res*. 1998 Jun;93(1-2):143-55.
- Hogg S, Sanger DJ, Moser PC. Mild traumatic lesion of the right parietal cortex in the rat: characterisation of a conditioned freezing deficit and its reversal by dizocilpine. *Behav Brain Res*. 1998 Jun;93(1-2):157-65.
- Hours M, Bernard M, Charnay P, Chossegros L, Javouhey E, Fort E, Boisson D, Sancho PO, Laumon B. Functional outcome after road-crash injury: description of the ESPARR victims cohort and 6-month follow-up results. *Accid Anal Prev*. 2010 Mar;42(2):412-21
- Huang H, Fan S, Ji X, Zhang Y, Bao F, Zhang G. Recombinant human erythropoietin protects against experimental spinal cord trauma injury by regulating expression of the proteins MKP-1 and p-ERK. *J Int Med Res*. 2009 Mar-Apr;37(2):511-9.
- H. Hugenholtz, D.E. Cass, M.F. Dvorak, D.H. Fewer, R.J. Fox, D.M.S. Izukawa, J. Lexchin, S. Tuli, N. Bharatwal, C. Short. High-Dose Methylprednisolone for Acute Closed Spinal Cord Injury – Only a Treatment Option. *Can. J. Neurol. Sci.* 2002; 29: 227-235.
- Huisman TA, Schwamm LH, Schaefer PW, Koroshetz WJ, Shetty-Alva N, Ozsunar Y, Wu O, Sorensen AG. Diffusion tensor imaging as potential biomarker of white matter injury in diffuse axonal injury. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2004 Mar;25(3):370-6.
- Igarashi T, Potts MB, Noble-Haeusslein LJ. Injury severity determines Purkinje cell loss and microglial activation in the cerebellum after cortical contusion injury. *Exp Neurol*. 2007 Jan;203(1):258-68.
- Immonen RJ, Kharatishvili I, Gröhn H, Pitkänen A, Gröhn OH. Quantitative MRI predicts long-term structural and functional outcome after experimental traumatic brain injury. *Neuroimage*. 2009 Mar 1;45(1):1-9.
- Immonen RJ, Kharatishvili I, Niskanen JP, Gröhn H, Pitkänen A, Gröhn OH. Distinct MRI pattern in lesional and perilesional area after traumatic brain injury in rat--11 months follow-up. *Exp Neurol*. 2009 Jan;215(1):29-40.

- Immonen RJ, Kharatishvili I, Sierra A, Einula C, Pitkänen A, Gröhn OH. Manganese enhanced MRI detects mossy fiber sprouting rather than neurodegeneration, gliosis or seizure-activity in the epileptic rat hippocampus. *Neuroimage*. 2008 May 1;40(4):1718-30.
- Iwai M, Cao G, Yin W, Stetler RA, Liu J, Chen J. Erythropoietin promotes neuronal replacement through revascularization and neurogenesis after neonatal hypoxia/ischemia in rats. *Stroke*. 2007 Oct;38(10):2795-803.
- Iwai M, Stetler RA, Xing J, Hu X, Gao Y, Zhang W, Chen J, Cao G. Enhanced oligodendrogenesis and recovery of neurological function by erythropoietin after neonatal hypoxic/ischemic brain injury. *Stroke*. 2010 May;41(5):1032-7.
- Iwata A, Chen XH, McIntosh TK, Browne KD, Smith DH. Long-term accumulation of amyloid-beta in axons following brain trauma without persistent upregulation of amyloid precursor protein genes. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002 Dec;61(12):1056-68.
- Jagoda AS, Bazarian JJ, Bruns JJ Jr, Cantrill SV, Gean AD, Howard PK, Ghajar J, Riggio S, Wright DW, Wears RL, Bakshy A, Burgess P, Wald MM, Whitson RR; American College of Emergency Physicians; Centers for Disease Control and Prevention. Clinical policy: neuroimaging and decisionmaking in adult mild traumatic brain injury in the acute setting. *Ann Emerg Med*. 2008 Dec;52(6):714-48.
- Javouhey E, Guérin AC, Chiron M. Incidence and risk factors of severe traumatic brain injury resulting from road accidents: a population-based study. *Accid Anal Prev*. 2006 Mar;38(2):225-33.
- Jennett B, Bond M. Assessment of outcome after severe brain damage. *Lancet*. 1975 Mar 1;1(7905):480-4.
- Jennett B, Snoek J, Bond MR, Brooks N. Disability after severe head injury: observations on the use of the Glasgow Outcome Scale. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1981 Apr;44(4):285-93.
- Jin KL, Mao XO, Nagayama T, Goldsmith PC, Greenberg DA. Induction of vascular endothelial growth factor receptors and phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling by global cerebral ischemia in the rat. *Neuroscience*. 2000;100(4):713-7.
- Jones NC, Cardamone L, Williams JP, Salzberg MR, Myers D, O'Brien TJ. Experimental traumatic brain injury induces a pervasive hyperanxious phenotype in rats. *J Neurotrauma*. 2008 Nov;25(11):1367-74.
- Jones NC, Cardamone L, Williams JP, Salzberg MR, Myers D, O'Brien TJ. Experimental traumatic brain injury induces a pervasive hyperanxious phenotype in rats. *J Neurotrauma*. 2008 Nov;25(11):1367-74.
- Jorge RE, Robinson RG, Moser D, Tateno A, Crespo-Facorro B, Arndt S. Major depression following traumatic brain injury. *Arch Gen Psychiatry*. 2004 Jan;61(1):42-50.
- Jorge RE, Starkstein SE, Arndt S, Moser D, Crespo-Facorro B, Robinson RG. Alcohol misuse and mood disorders following traumatic brain injury. *Arch Gen Psychiatry*. 2005 Jul;62(7):742-9.
- Juul SE, Anderson DK, Li Y, Christensen RD. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res*. 1998 Jan;43(1):40-9.
- Juul SE, Stallings SA, Christensen RD. Erythropoietin in the cerebrospinal fluid of neonates who sustained CNS injury. *Pediatr Res*. 1999 Nov;46(5):543-7.
- Juul SE, Yachnis AT, Rojiani AM, Christensen RD. Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatr Dev Pathol*. 1999 Mar-Apr;2(2):148-58.
- Kamm K, Vanderkolk W, Lawrence C, Jonker M, Davis AT. The effect of traumatic brain injury upon the concentration and expression of interleukin-1beta and interleukin-10 in the rat. *J Trauma*. 2006 ;60(1):152-7.
- Keenan HT, Hall GC, Marshall SW. Early head injury and attention deficit hyperactivity disorder: retrospective cohort study. *BMJ*. 2008 Nov 6;337:a1984. doi: 10.1136/bmj.a1984.
- Kennedy JE, Jaffee MS, Leskin GA, Stokes JW, Leal FO, Fitzpatrick PJ. Posttraumatic stress disorder and posttraumatic stress disorder-like symptoms and mild traumatic brain injury. *J Rehabil Res Dev*. 2007;44(7):895-920.
- Kharatishvili I, Immonen R, Gröhn O, Pitkänen A. Quantitative diffusion MRI of hippocampus as a surrogate marker for post-traumatic epileptogenesis. *Brain*. 2007 Dec;130(Pt 12):3155-68.

- Kharatishvili I, Sierra A, Immonen RJ, Gröhn OH, Pitkänen A. Quantitative T2 mapping as a potential marker for the initial assessment of the severity of damage after traumatic brain injury in rat. *Exp Neurol*. 2009 May;217(1):154-64.
- Kilic E, Kilic U, Soliz J, Bassetti CL, Gassmann M, Hermann DM. Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK-1/-2 and Akt pathways. *FASEB J*. 2005 Dec;19(14):2026-8.
- Kilic U, Kilic E, Soliz J, Bassetti CI, Gassmann M, Hermann DM. Erythropoietin protects from axotomy-induced degeneration of retinal ganglion cells by activating ERK-1/-2. *FASEB J*. 2005 Feb;19(2):249-51.
- Kinnunen KM, Greenwood R, Powell JH, Leech R, Hawkins PC, Bonnelle V, Patel MC, Counsell SJ, Sharp DJ. White matter damage and cognitive impairment after traumatic brain injury. *Brain*. 2011 Feb;134(Pt 2):449-63.
- Koren D, Arnon I, Klein E. Acute stress response and posttraumatic stress disorder in traffic accident victims: a one-year prospective, follow-up study. *Am J Psychiatry*. 1999 Mar;156(3):367-73.
- Koren D, Norman D, Cohen A, Berman J, Klein EM. Increased PTSD risk with combat-related injury: a matched comparison study of injured and uninjured soldiers experiencing the same combat events. *Am J Psychiatry*. 2005 Feb;162(2):276-82.
- Kumar R, Husain M, Gupta RK, Hasan KM, Haris M, Agarwal AK, Pandey CM, Narayana PA. Serial changes in the white matter diffusion tensor imaging metrics in moderate traumatic brain injury and correlation with neuro-cognitive function. *J Neurotrauma*. 2009 Apr;26(4):481-95.
- Kumral A, Baskin H, Gokmen N, Yilmaz O, Genc K, Genc S, Tatli MM, Duman N, Ozer E, Ozkan H. Selective inhibition of nitric oxide in hypoxic-ischemic brain model in newborn rats: is it an explanation for the protective role of erythropoietin? *Biol Neonate*. 2004;85(1):51-4.
- Kumral A, Gonenc S, Acikgoz O, Sonmez A, Genc K, Yilmaz O, Gokmen N, Duman N, Ozkan H. Erythropoietin increases glutathione peroxidase enzyme activity and decreases lipid peroxidation levels in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate*. 2005;87(1):15-8. Epub 2004 Aug 27.
- Kumral A, Uysal N, Tugyan K, Sonmez A, Yilmaz O, Gokmen N, Kiray M, Genc S, Duman N, Koroglu TF, Ozkan H, Genc K. Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Behav Brain Res*. 2004 Aug 12;153(1):77-86.
- Kwon BK, Okon E, Hillyer J, Mann C, Baptiste D, Weaver LC, Fehlings MG, Tetzlaff W. A systematic review of non-invasive pharmacologic neuroprotective treatments for acute spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2011 Aug;28(8):1545-88.
- Kwon BK, Okon EB, Tsai E, Beattie MS, Bresnahan JC, Magnuson DK, Reier PJ, McTigue DM, Popovich PG, Blight AR, Oudega M, Guest JD, Weaver LC, Fehlings MG, Tetzlaff W. A grading system to evaluate objectively the strength of pre-clinical data of acute neuroprotective therapies for clinical translation in spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2011 Aug;28(8):1525-43.
- Lauritzen M, Dreier JP, Fabricius M, Hartings JA, Graf R, Strong AJ. Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011 Jan;31(1):17-35.
- Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R, Villa P, Fratelli M, Savino C, Bianchi M, Nielsen J, Gerwien J, Kallunki P, Larsen AK, Helboe L, Christensen S, Pedersen LO, Nielsen M, Torup L, Sager T, Sfacteria A, Erbayraktar S, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Cerami-Hand C, Xie QW, Coleman T, Cerami A, Brines M. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science*. 2004 Jul 9;305(5681):239-42.
- Lenzlinger PM, Morganti-Kossmann MC, Laurer HL, McIntosh TK. The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury. *Mol Neurobiol*. 2001 Aug-Dec;24(1-3):169-81
- Lenzlinger PM, Morganti-Kossmann MC, Laurer HL, McIntosh TK. The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury. *Mol Neurobiol*. 2001 Aug-Dec;24(1-3):169-81.
- Lescot T, Fulla-Oller L, Po C, Chen XR, Puybasset L, Gillet B, Plotkine M, Meric P, Marchand-Leroux C. Temporal and regional changes after focal traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2010 Jan;27(1):85-94.

- Levin HS, Wilde E, Troyanskaya M, Petersen NJ, Scheibel R, Newsome M, Radaideh M, Wu T, Yallampalli R, Chu Z, Li X. Diffusion tensor imaging of mild to moderate blast-related traumatic brain injury and its sequelae. *J Neurotrauma*. 2010 Apr;27(4):683-94.
- Li F, Chong ZZ, Maiese K. Microglial integrity is maintained by erythropoietin through integration of Akt and its substrates of glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , beta-catenin, and nuclear factor-kappaB. *Curr Neurovasc Res*. 2006 Aug;3(3):187-201.
- Li S, Kuroiwa T, Ishibashi S, Sun L, Endo S, Ohno K. Transient cognitive deficits are associated with the reversible accumulation of amyloid precursor protein after mild traumatic brain injury. *Neurosci Lett*. 2006 Dec 6;409(3):182-6.
- Li S, Kuroiwa T, Katsumata N, Ishibashi S, Sun L, Endo S, Ohno K. Unilateral spatial neglect and memory deficit associated with abnormal beta-amyloid precursor protein accumulation after lateral fluid percussion injury in Mongolian gerbils. *Acta Neurochir Suppl*. 2006;96:144-7.
- Liao ZB, Jiang GY, Tang ZH, Zhi XG, Sun XC, Tang WY, Wu MJ. Erythropoietin can promote survival of cerebral cells by downregulating Bax gene after traumatic brain injury in rats. *Neurol India*. 2009 Nov-Dec;57(6):722-8.
- Liao ZB, Zhi XG, Shi QH, He ZH. Recombinant human erythropoietin administration protects cortical neurons from traumatic brain injury in rats. *Eur J Neurol*. 2008 Feb;15(2):140-9.
- Lieutaud T, Andrews PJ, Rhodes JK, Williamson R. Characterization of the pharmacokinetics of human recombinant erythropoietin in blood and brain when administered immediately after lateral fluid percussion brain injury and its pharmacodynamic effects on IL-1 $\beta$  and MIP-2 in rats. *J Neurotrauma*. 2008 Oct;25(10):1179-85.
- Lieutaud T, Tassin C, Wallet F, Macabeo C, Lefevre M, David JS. Prise en charge en urgence du patient avec un traumatisme vertébro- médullaire. 52<sup>e</sup> congrès de la SFAR. Urgences Vitales. (2010) [http://sofia.medicalistes.org/spip/IMG/pdf/prise\\_en\\_charge\\_en\\_urgence\\_des\\_traumatismes\\_vertebro\\_medullaires.pdf](http://sofia.medicalistes.org/spip/IMG/pdf/prise_en_charge_en_urgence_des_traumatismes_vertebro_medullaires.pdf)
- Lieutaud T, Ndiaye A, Frost F, Chiron M; Registry Group. A 10-year population survey of spinal trauma and spinal cord injuries after road accidents in the Rhône area. *J Neurotrauma*. 2010 Jun;27(6):1101-7.
- Lieutaud T, Ndiaye A, Laumon B, Chiron M. Spinal cord injuries sustained in road crashes are not on the decrease in France: A study based on epidemiological trends. *J Neurotrauma*. 2011 Sep 6. [Epub ahead of print]
- Lifshitz J, Friberg H, Neumar RW, Raghupathi R, Welsh FA, Janmey P, Saatman KE, Wieloch T, Grady MS, McIntosh TK. Structural and functional damage sustained by mitochondria after traumatic brain injury in the rat: evidence for differentially sensitive populations in the cortex and hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003 Feb;23(2):219-31.
- Lifshitz J, Sullivan PG, Hovda DA, Wieloch T, McIntosh TK. Mitochondrial damage and dysfunction in traumatic brain injury. *Mitochondrion*. 2004 Sep;4(5-6):705-13.
- Lighthall JW: Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *J Neurotrauma*. 1988; 5:1-15
- Lippert-Grüner M, Kuchta J, Hellmich M, Klug N. Neurobehavioural deficits after severe traumatic brain injury (TBI). *Brain Inj*. 2006 Jun;20(6):569-74.
- Lipsic E, van der Meer P, Voors AA, Westenbrink BD, van den Heuvel AF, de Boer HC, van Zonneveld AJ, Schoemaker RG, van Gilst WH, Zijlstra F, van Veldhuisen DJ. A single bolus of a long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alfa in patients with acute myocardial infarction: a randomized feasibility and safety study. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2006 Apr;20(2):135-41.
- Liu YR, Cardamone L, Hogan RE, Gregoire MC, Williams JP, Hicks RJ, Binns D, Koe A, Jones NC, Myers DE, O'Brien TJ, Boullieret V. Progressive metabolic and structural cerebral perturbations after traumatic brain injury: an in vivo imaging study in the rat. *J Nucl Med*. 2010 Nov;51(11):1788-95.
- Liumbruno GM, Bennardello F, Lattanzio A, Piccoli P, Rossetti G; Italian Society of Transfusion Medicine and Immunohaematology (SIMTI) Working Party. Recommendations for the transfusion management of patients in the peri-operative period. I. The pre-operative period. *Blood Transfus*. 2011 Jan;9(1):19-40.

- Liembruno GM, Bennardello F, Lattanzio A, Piccoli P, Rossetti G; Italian Society of Transfusion Medicine and Immunohaematology (SIMTI) Working Party. Recommendations for the transfusion management of patients in the peri-operative period. II. The intra-operative period. *Blood Transfus.* 2011 Apr;9(2):189-217.
- Liembruno GM, Bennardello F, Lattanzio A, Piccoli P, Rossetti G; Italian Society of Transfusion Medicine and Immunohaematology Working Party. Recommendations for the transfusion management of patients in the peri-operative period. III. The post-operative period. *Blood Transfus.* 2011 Jul;9(3):320-35.
- Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Apr 25;92(9):3717-20.
- Louin G, Marchand-Verrecchia C, Palmier B, Plotkine M, Jafarian-Tehrani M. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces neurological deficit but not cerebral edema following traumatic brain injury. *Neuropharmacology.* 2006 Feb;50(2):182-90.
- Lowenstein DH. Epilepsy after head injury: an overview. *Epilepsia.* 2009 Feb;50 Suppl 2:4-9.
- Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerard C, Rollins BJ. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med.* 1998 Feb 16;187(4):601-8.
- Lu D, Mahmood A, Qu C, Goussev A, Schallert T, Chopp M. Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2005 Sep;22(9):1011-7.
- Lu KT, Wang YW, Yang JT, Yang YL, Chen HI. Effect of interleukin-1 on traumatic brain injury-induced damage to hippocampal neurons. *J Neurotrauma.* 2005 Aug;22(8):885-95.
- Ludman AJ, Yellon DM, Hasleton J, Ariti C, Babu GG, Boston-Griffiths E, Venugopal V, Walker M, Holdright D, Swanton H, Crake T, Brull D, Moon JC, Puranik R, Muthurangu V, Taylor A, Hausenloy DJ. Effect of erythropoietin as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention: a randomised controlled clinical trial. *Heart.* 2011 Oct;97(19):1560-5.
- Mac Donald CL, Dikranian K, Bayly P, Holtzman D, Brody D. Diffusion tensor imaging reliably detects experimental traumatic axonal injury and indicates approximate time of injury. *J Neurosci.* 2007 Oct 31;27(44):11869-76.
- Mac Donald CL, Dikranian K, Song SK, Bayly PV, Holtzman DM, Brody DL. Detection of traumatic axonal injury with diffusion tensor imaging in a mouse model of traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2007 May;205(1):116-31
- Mac Donald CL, Johnson AM, Cooper D, Nelson EC, Werner NJ, Shimony JS, Snyder AZ, Raichle ME, Witherow JR, Fang R, Flaherty SF, Brody DL. Detection of blast-related traumatic brain injury in U.S. military personnel. *N Engl J Med.* 2011 Jun 2;364(22):2091-100.
- Mahmood A, Lu D, Qu C, Goussev A, Zhang ZG, Lu C, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in rats with erythropoietin and carbamylated erythropoietin. *J Neurosurg.* 2007 Aug;107(2):392-7.
- Maiese K, Hou J, Chong ZZ, Shang YC. Erythropoietin, forkhead proteins, and oxidative injury: biomarkers and biology. *ScientificWorldJournal.* 2009 Oct 2;9:1072-104.
- Malec JF, Brown AW, Leibson CL, Flaada JT, Mandrekar JN, Diehl NN, Perkins PK. The mayo classification system for traumatic brain injury severity. *J Neurotrauma.* 2007 Sep;24(9):1417-24.
- Maller JJ, Thomson RH, Lewis PM, Rose SE, Pannek K, Fitzgerald PB. Traumatic brain injury, major depression, and diffusion tensor imaging: making connections. *Brain Res Rev.* 2010 Sep;64(1):213-40.
- Mamata H, Jolesz FA, Maier SE. Characterization of central nervous system structures by magnetic resonance diffusion anisotropy. *Neurochem Int.* 2004 Sep;45(4):553-60.
- Mamere AE, Saraiva LA, Matos AL, Carneiro AA, Santos AC. Evaluation of delayed neuronal and axonal damage secondary to moderate and severe traumatic brain injury using quantitative MR imaging techniques. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2009 May;30(5):947-52.
- Marciano P, Eberwine JH, Raghupathi R, McIntosh TK. The assessment of genomic alterations using DNA arrays following traumatic brain injury: a review. *Restor Neurol Neurosci.* 2001;18(2-3):105-13.

- Marciano PG, Eberwine JH, Ragupathi R, Saatman KE, Meaney DF, McIntosh TK. Expression profiling following traumatic brain injury: a review. *Neurochem Res.* 2002 Oct;27(10):1147-55.
- Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg.* 1994 Feb;80(2):291-300.
- Marshall LF, Marshall SB, Klauber MR, Van Berkum Clark M, Eisenberg H, Jane JA, Luerssen TG, Marmarou A, Foulkes MA. The diagnosis of head injury requires a classification based on computed axial tomography. *J Neurotrauma.* 1992 Mar;9 Suppl 1:S287-92.
- Masson F, Thicoipe M, Aye P, Mokni T, Senjean P, Schmitt V, Dessalles PH, Cazaugade M, Labadens P; Aquitaine Group for Severe Brain Injuries Study. Epidemiology of severe brain injuries: a prospective population-based study. *J Trauma.* 2001 Sep;51(3):481-9.
- Matchett G, Hahn J, Obenaus A, Zhang J. Surgically induced brain injury in rats: the effect of erythropoietin. *J Neurosci Methods.* 2006 Dec 15;158(2):234-41.
- McIntosh TK, Soares H, Thomas M, Cloherty K. Development of regional cerebral oedema after lateral fluid-percussion brain injury in the rat. *Acta Neurochir Suppl (Wien).* 1990;51:263-4.
- McIntosh TK, Vink R, Noble L, Yamakami I, Fernyak S, Soares H, Faden AL. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. *Neuroscience.* 1989;28(1):233-44.
- McMillan TM, Teasdale GM, Weir CJ, Stewart E. Death after head injury: the 13 year outcome of a case control study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2011 Aug;82(8):931-5.
- McMillan TM, Teasdale GM. Death rate is increased for at least 7 years after head injury: a prospective study. *Brain.* 2007 Oct;130(Pt 10):2520-7.
- Mellergård P, Åneman O, Sjögren F, Säberg C, Hillman J. Differences in cerebral extracellular response of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, and interleukin-10 after subarachnoid hemorrhage or severe head trauma in humans. *Neurosurgery.* 2011 Jan;68(1):12-9.
- Meng Y, Xiong Y, Mahmood A, Zhang Y, Qu C, Chopp M. Dose-dependent neurorestorative effects of delayed treatment of traumatic brain injury with recombinant human erythropoietin in rats. *J Neurosurg.* 2011 Sep;115(3):550-60.
- Moon C, Krawczyk M, Paik D, Coleman T, Brines M, Juhaszova M, Sollott SJ, Lakatta EG, Talan MI. Erythropoietin, modified to not stimulate red blood cell production, retains its cardioprotective properties. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Mar;316(3):999-1005.
- Moon C, Krawczyk M, Paik D, Lakatta EG, Talan MI. Cardioprotection by recombinant human erythropoietin following acute experimental myocardial infarction: dose response and therapeutic window. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2005 Aug;19(4):243-50.
- Moore EL, Terryberry-Spohr L, Hope DA. Mild traumatic brain injury and anxiety sequelae: a review of the literature. *Brain Inj.* 2006 Feb;20(2):117-32.
- Morales DM, Marklund N, Lebold D, Thompson HJ, Pitkanen A, Maxwell WL, Longhi L, Laurer H, Maegele M, Neugebauer E, Graham DI, Stocchetti N, McIntosh TK. Experimental models of traumatic brain injury: do we really need to build a better mousetrap? *Neuroscience.* 2005;136(4):971-89.
- Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Otto VI, Stahel PF, Kossmann T. Role of cerebral inflammation after traumatic brain injury: a revisited concept. *Shock.* 2001 Sep;16(3):165-77.
- Morganti-Kossmann MC, Satgunaseelan L, Bye N, Kossmann T. Modulation of immune response by head injury. *Injury.* 2007 Dec;38(12):1392-400.
- Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience.* 1997 Jan;76(1):105-16.
- Myburgh JA, Cooper DJ, Finfer SR, Venkatesh B, Jones D, Higgins A, Bishop N, Hignett T; Australasian Traumatic Brain Injury Study (ATBIS) Investigators for the Australian; New Zealand Intensive Care Society Clinical Trials Group. Epidemiology and 12-month outcomes from traumatic brain injury in australia and new zealand. *J Trauma.* 2008 Apr;64(4):854-62.

- Najjar SS, Rao SV, Melloni C, Raman SV, Povsic TJ, Melton L, Barsness GW, Prather K, Heitner JF, Kilaru R, Gruberg L, Hasselblad V, Greenbaum AB, Patel M, Kim RJ, Talan M, Ferrucci L, Longo DL, Lakatta EG, Harrington RA; REVEAL Investigators. Intravenous erythropoietin in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: REVEAL: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2011 May 11;305(18):1863-72.
- Nakamura T, Ebihara I, Shimada N, Koide H. Elevated levels of erythropoietin in cerebrospinal fluid of depressed patients. *Am J Med Sci*. 1998 Mar;315(3):199-201.
- Nampiaparampil DE. Prevalence of chronic pain after traumatic brain injury: a systematic review. *JAMA*. 2008 Aug 13;300(6):711-9.
- Nampiaparampil DE. Prevalence of chronic pain after traumatic brain injury: a systematic review. *JAMA*. 2008 Aug 13;300(6):711-9.
- Napolitano LM, Fabian TC, Kelly KM, Bailey JA, Block EF, Langholff W, Enny C, Corwin HL. Improved survival of critically ill trauma patients treated with recombinant human erythropoietin. *J Trauma*. 2008 Aug;65(2):285-97;
- Navarro FP, Fares RP, Sanchez PE, Nadam J, Georges B, Moulin C, Morales A, Pequignot JM, Bezin L. Brain heparanase expression is up-regulated during postnatal development and hypoxia-induced neovascularization in adult rats. *J Neurochem*. 2008 Apr;105(1):34-45.
- Ndiaye A, Chambost M, Chiron M. The fatal injuries of car drivers. *Forensic Sci Int*. 2009 Jan 30;184(1-3):21-7.
- Newcombe V, Chatfield D, Outtrim J, Vowler S, Manktelow A, Cross J, Scoffings D, Coleman M, Hutchinson P, Coles J, Carpenter TA, Pickard J, Williams G, Menon D. Mapping traumatic axonal injury using diffusion tensor imaging: correlations with functional outcome. *PLoS One*. 2011 May 4;6(5):e19214.
- Ning R, Xiong Y, Mahmood A, Zhang Y, Meng Y, Qu C, Chopp M. Erythropoietin promotes neurovascular remodeling and long-term functional recovery in rats following traumatic brain injury. *Brain Res*. 2011 Apr 12;1384:140-50.
- Niogi SN, Mukherjee P, Ghajar J, Johnson C, Kolster RA, Sarkar R, Lee H, Meeker M, Zimmerman RD, Manley GT, McCandliss BD. Extent of microstructural white matter injury in postconcussive syndrome correlates with impaired cognitive reaction time: a 3T diffusion tensor imaging study of mild traumatic brain injury. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2008 May;29(5):967-73. Epub 2008 Feb 13.
- Niogi SN, Mukherjee P. Diffusion tensor imaging of mild traumatic brain injury. *J Head Trauma Rehabil*. 2010 Jul-Aug;25(4):241-55.
- Nonaka M, Chen XH, Pierce JE, Leoni MJ, McIntosh TK, Wolf JA, Smith DH. Prolonged activation of NF-kappaB following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma*. 1999 Nov;16(11):1023-34.
- Obenaus A, Robbins M, Blanco G, Galloway NR, Snissarenko E, Gillard E, Lee S, Currás-Collazo M. Multi-modal magnetic resonance imaging alterations in two rat models of mild neurotrauma. *J Neurotrauma*. 2007 Jul;24(7):1147-60.
- ONISR 2009;  
[http://www.securiteroutiere.gouv.fr/IMG/pdf/26-observatoire\\_vitesses\\_3Q2010\\_final\\_cle25e114.pdf](http://www.securiteroutiere.gouv.fr/IMG/pdf/26-observatoire_vitesses_3Q2010_final_cle25e114.pdf).
- Otto VI, Stahel PF, Rancan M, Kariya K, Shohami E, Yatsiv I, Eugster HP, Kossmann T, Trentz O, Morganti-Kossmann MC. Regulation of chemokines and chemokine receptors after experimental closed head injury. *Neuroreport*. 2001 Jul 3;12(9):2059-64.
- Ozawa T, Toba K, Suzuki H, Kato K, Iso Y, Akutsu Y, Kobayashi Y, Takeyama Y, Kobayashi N, Yoshimura N, Akazawa K, Aizawa Y; EPO/AMI-I Pilot Study Researchers. Single-dose intravenous administration of recombinant human erythropoietin is a promising treatment for patients with acute myocardial infarction - randomized controlled pilot trial of EPO/AMI-1 study -. *Circ J*. 2010 Jul;74(7):1415-23.
- Pasco A, Lemaire L, Franconi F, Lefur Y, Noury F, Saint-André JP, Benoit JP, Cozzzone PJ, Le Jeune JJ. Perfusional deficit and the dynamics of cerebral edemas in experimental traumatic brain injury using perfusion and diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *J Neurotrauma*. 2007 Aug;24(8):1321-30.
- Pearson H. Cancer patients opt for unapproved drug. *Nature*. 2007 Mar 29;446(7135):474-5.

- Pettigrew LE, Wilson JT, Teasdale GM. Assessing disability after head injury: improved use of the Glasgow Outcome Scale. *J Neurosurg*. 1998 Dec;89(6):939-43.
- Pierce JE, Trojanowski JQ, Graham DI, Smith DH, McIntosh TK. Immunohistochemical characterization of alterations in the distribution of amyloid precursor proteins and beta-amyloid peptide after experimental brain injury in the rat. *J Neurosci*. 1996 Feb 1;16(3):1083-90.
- Pillay NS, Kellaway LA, Kotwal GJ. Vaccinia virus complement control protein significantly improves sensorimotor function recovery after severe head trauma. *Brain Res*. 2007 Jun 11;1153:158-65. Epub 2007 Mar 24.
- Pirouzmand F. Epidemiological trends of spine and spinal cord injuries in the largest Canadian adult trauma center from 1986 to 2006. *J Neurosurg Spine*. 2010 Feb;12(2):131-40.
- Ploumis A, Yadlapalli N, Fehlings MG, Kwon BK, Vaccaro AR. A systematic review of the evidence supporting a role for vasopressor support in acute SCI. *Spinal Cord*. 2010 May;48(5):356-62.
- Pointillart V, Petitjean ME, Wiart L, Vital JM, Lassié P, Thicoipé M, Dabadie P. Pharmacological therapy of spinal cord injury during the acute phase. *Spinal Cord*. 2000 Feb;38(2):71-6.
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*. 1978 Feb 15;47(4):379-91.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. "Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol*. 1978 Oct 1;51(3):291-4.
- Prass K, Scharff A, Ruscher K, Löwl D, Muselmann C, Victorov I, Kapinya K, Dirnagl U, Meisel A. Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin. *Stroke*. 2003 Aug;34(8):1981-6.
- Qian L, Nagaoka T, Ohno K, Tominaga B, Nariai T, Hirakawa K, Kuroiwa T, Takakuda K, Miyairi H. Magnetic resonance imaging and pathologic studies on lateral fluid percussion injury as a model of focal brain injury in rats. *Bull Tokyo Med Dent Univ*. 1996 Sep;43(3):53-66.
- Raghupathi R, Conti AC, Graham DI, Krajewski S, Reed JC, Grady MS, Trojanowski JQ, McIntosh TK. Mild traumatic brain injury induces apoptotic cell death in the cortex that is preceded by decreases in cellular Bcl-2 immunoreactivity. *Neuroscience*. 2002;110(4):605-16.
- Raghupathi R, Strauss KI, Zhang C, Krajewski S, Reed JC, McIntosh TK. Temporal alterations in cellular Bax:Bcl-2 ratio following traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma*. 2003 May;20(5):421-35.
- Rancan M, Otto VI, Hans VH, Gerlach I, Jork R, Trentz O, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. Upregulation of ICAM-1 and MCP-1 but not of MIP-2 and sensorimotor deficit in response to traumatic axonal injury in rats. *J Neurosci Res*. 2001 Mar 1;63(5):438-46.
- Rhodes JK, Andrews PJ, Holmes MC, Seckl JR. Expression of interleukin-6 messenger RNA in a rat model of diffuse axonal injury. *Neurosci Lett*. 2002 Dec 19;335(1):1-4.
- Rhodes JK, Sharkey J, Andrews PJ. The temporal expression, cellular localization, and inhibition of the chemokines MIP-2 and MCP-1 after traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma*. 2009 Apr;26(4):507-25.
- Rodriguez RM, Corwin HL, Gettinger A, Corwin MJ, Gubler D, Pearl RG. Nutritional deficiencies and blunted erythropoietin response as causes of the anemia of critical illness. *J Crit Care*. 2001 Mar;16(1):36-41.
- Rogatsky GG, Sonn J, Kamenir Y, Zarchin N, Mayevsky A. Relationship between intracranial pressure and cortical spreading depression following fluid percussion brain injury in rats. *J Neurotrauma*. 2003 Dec;20(12):1315-25.
- Rogiers P, Zhang H, Leeman M, Nagler J, Neels H, Mélot C, Vincent JL. Erythropoietin response is blunted in critically ill patients. *Intensive Care Med*. 1997 Feb;23(2):159-62.
- Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, Rütther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Sirén AL. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med*. 2002 Aug;8(8):495-505.
- Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki S, Masuda S, Sasaki R. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Dec 9;253(1):26-32.

- Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Apr 14;95(8):4635-40.
- Salmond CH, Menon DK, Chatfield DA, Williams GB, Pena A, Sahakian BJ, Pickard JD. Diffusion tensor imaging in chronic head injury survivors: correlations with learning and memory indices. *Neuroimage*. 2006 Jan 1;29(1):117-24.
- Sanchez PE, Fares RP, Risso JJ, Bonnet C, Bouvard S, Le-Cavorsin M, Georges B, Moulin C, Belmeguenai A, Bodennec J, Morales A, Pequignot JM, Baulieu EE, Levine RA, Bezin L. Optimal neuroprotection by erythropoietin requires elevated expression of its receptor in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jun 16;106(24):9848-53.
- Sanchez PE, Navarro FP, Fares RP, Nadam J, Georges B, Moulin C, Le Cavorsin M, Bonnet C, Ryvlin P, Belmeguenai A, Bodennec J, Morales A, Bezin L. Erythropoietin receptor expression is concordant with erythropoietin but not with common beta chain expression in the rat brain throughout the life span. *J Comp Neurol*. 2009 Jun 1;514(4):403-14.
- Sanders MJ, Dietrich WD, Green EJ. Behavioral, electrophysiological, and histopathological consequences of mild fluid-percussion injury in the rat. *Brain Res*. 2001 Jun 15;904(1):141-4.
- Sanders MJ, Sick TJ, Perez-Pinzon MA, Dietrich WD, Green EJ. Chronic failure in the maintenance of long-term potentiation following fluid percussion injury in the rat. *Brain Res*. 2000 Apr 7;861(1):69-76.
- Sato M, Chang E, Igarashi T, Noble LJ. Neuronal injury and loss after traumatic brain injury: time course and regional variability. *Brain Res*. 2001 Oct 26;917(1):45-54.
- Saur D, Kreher BW, Schnell S, Kümmerer D, Kellmeyer P, Vry MS, Umarova R, Musso M, Glauche V, Abel S, Huber W, Rijntjes M, Hennig J, Weiller C. Ventral and dorsal pathways for language. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Nov 18;105(46):18035-40.
- Schaefer PW, Huisman TA, Sorensen AG, Gonzalez RG, Schwamm LH. Diffusion-weighted MR imaging in closed head injury: high correlation with initial glasgow coma scale score and score on modified Rankin scale at discharge. *Radiology*. 2004 Oct;233(1):58-66.
- Schütz C, Stover JF, Thompson HJ, Hoover RC, Morales DM, Schouten JW, McMillan A, Soltesz K, Motta M, Spangler Z, Neugebauer E, McIntosh TK. Acute, transient hemorrhagic hypotension does not aggravate structural damage or neurologic motor deficits but delays the long-term cognitive recovery following mild to moderate traumatic brain injury. *Crit Care Med*. 2006 Feb;34(2):492-501.
- SCITI. Spinal Cord Injury Thromboprophylaxis Investigators. Prevention of venous thromboembolism in the acute treatment phase after spinal cord injury: A randomized, multicenter trial comparing low-dose heparin plus intermittent pneumatic compression with enoxaparin. *J Trauma*. 2003 ; 54 : 1116 -1126.
- Shein NA, Grigoriadis N, Alexandrovich AG, Simeonidou C, Spandou E, Tsender J, Yatsiv I, Horowitz M, Shohami E. Differential neuroprotective properties of endogenous and exogenous erythropoietin in a mouse model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2008 Feb;25(2):112-23.
- Shein NA, Grigoriadis N, Alexandrovich AG, Simeonidou C, Spandou E, Tsender J, Yatsiv I, Horowitz M, Shohami E. Differential neuroprotective properties of endogenous and exogenous erythropoietin in a mouse model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2008 Feb;25(2):112-23.
- Shimamura M, Garcia JM, Prough DS, Hellmich HL. Laser capture microdissection and analysis of amplified antisense RNA from distinct cell populations of the young and aged rat brain: effect of traumatic brain injury on hippocampal gene expression. *Brain Res Mol Brain Res*. 2004 Mar 17;122(1):47-61.
- Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci*. 2001 Dec 15;21(24):9733-43.
- Showalter PE, Kimmel DN. Stimulating consciousness and cognition following severe brain injury: a new potential clinical use for lamotrigine. *Brain Inj*. 2000 Nov;14(11):997-1001.
- Siman R, McIntosh TK, Soltesz KM, Chen Z, Neumar RW, Roberts VL. Proteins released from degenerating neurons are surrogate markers for acute brain damage. *Neurobiol Dis*. 2004 Jul;16(2):311-20.

- Sirén AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Mar 27;98(7):4044-9.
- Sirén AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Brück W, Ehrenreich H. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol*. 2001 Mar;101(3):271-6.
- Sirén AL, Radyushkin K, Boretius S, Kämmer D, Riechers CC, Natt O, Sargin D, Watanabe T, Sperling S, Michaelis T, Price J, Meyer B, Frahm J, Ehrenreich H. Global brain atrophy after unilateral parietal lesion and its prevention by erythropoietin. *Brain*. 2006 Feb;129(Pt 2):480-9.
- Smith DH, Chen XH, Pierce JE, Wolf JA, Trojanowski JQ, Graham DI, McIntosh TK. Progressive atrophy and neuron death for one year following brain trauma in the rat. *J Neurotrauma*. 1997 Oct;14(10):715-27.
- Smits M, Dippel DW, de Haan GG, Dekker HM, Vos PE, Kool DR, Nederkoorn PJ, Hofman PA, Twijnstra A, Tanghe HL, Hunink MG. External validation of the Canadian CT Head Rule and the New Orleans Criteria for CT scanning in patients with minor head injury. *JAMA*. 2005 Sep 28;294(12):1519-25.
- Soares HD, Hicks RR, Smith D, McIntosh TK. Inflammatory leukocytic recruitment and diffuse neuronal degeneration are separate pathological processes resulting from traumatic brain injury. *J Neurosci*. 1995 Dec;15(12):8223-33.
- Sola A, Rogido M, Lee BH, Genetta T, Wen TC. Erythropoietin after focal cerebral ischemia activates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway and improves brain injury in postnatal day 7 rats. *Pediatr Res*. 2005 Apr;57(4):481-7.
- Spain A, Daumas S, Lifshitz J, Rhodes J, Andrews PJ, Horsburgh K, Fowler JH. Mild fluid percussion injury in mice produces evolving selective axonal pathology and cognitive deficits relevant to human brain injury. *J Neurotrauma*. 2010 Aug;27(8):1429-38.
- Spandou E, Papoutsopoulou S, Soubasi V, Karkavelas G, Simeonidou C, Kremenopoulos G, Guiba-Tziampiri O. Hypoxia-ischemia affects erythropoietin and erythropoietin receptor expression pattern in the neonatal rat brain. *Brain Res*. 2004 Sep 24;1021(2):167-72.
- Spandou E, Soubasi V, Papoutsopoulou S, Karkavelas G, Simeonidou C, Kaiki-Astara A, Guiba-Tziampiri O. Erythropoietin prevents hypoxia/ischemia-induced DNA fragmentation in an experimental model of perinatal asphyxia. *Neurosci Lett*. 2004 Aug 5;366(1):24-8.
- Springborg JB, Ma X, Rochat P, Knudsen GM, Amtorp O, Paulson OB, Juhler M, Olsen NV. A single subcutaneous bolus of erythropoietin normalizes cerebral blood flow autoregulation after subarachnoid haemorrhage in rats. *Br J Pharmacol*. 2002 Feb;135(3):823-9.
- Springborg JB, Møller C, Gideon P, Jørgensen OS, Juhler M, Olsen NV. Erythropoietin in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage: a double blind randomised clinical trial. *Acta Neurochir (Wien)*. 2007 Nov;149(11):1089-101; discussion 1101.
- Springborg JB, Sonne B, Frederiksen HJ, Foldager N, Poulsgaard L, Klausen T, Jørgensen OS, Olsen NV. Erythropoietin in the cerebrospinal fluid of patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage originates from the brain. *Brain Res*. 2003 Sep 12;984(1-2):143-8.
- Stein 2009 [http://mbldownloads.com/0109CNS\\_Suppl1Stein.pdf](http://mbldownloads.com/0109CNS_Suppl1Stein.pdf)
- Stein DJ, Ipser JC, Seedat S. Pharmacotherapy for post traumatic stress disorder (PTSD). *Cochrane Database Syst Rev*. 2006 Jan 25;(1):CD002795.
- Stiell IG, Clement CM, Rowe BH, Schull MJ, Brison R, Cass D, Eisenhauer MA, McKnight RD, Bandiera G, Holroyd B, Lee JS, Dreyer J, Worthington JR, Reardon M, Greenberg G, Lesiuk H, MacPhail I, Wells GA. Comparison of the Canadian CT Head Rule and the New Orleans Criteria in patients with minor head injury. *JAMA*. 2005 Sep 28;294(12):1511-8.
- Strangman GE, O'Neil-Pirozzi TM, Supelana C, Goldstein R, Katz DI, Glenn MB. Regional brain morphometry predicts memory rehabilitation outcome after traumatic brain injury. *Front Hum Neurosci*. 2010 Oct 14;4:182.
- Sughrue ME, Mocco J, Komotar RJ, Mehra A, D'Ambrosio AL, Grobelny BT, Penn DL, Connolly ES Jr. An improved test of neurological dysfunction following transient focal cerebral ischemia in rats. *J Neurosci Methods*. 2006 Mar 15;151(2):83-9.

- Sukhotinsky I, Dilekoz E, Moskowitz MA, Ayata C. Hypoxia and hypotension transform the blood flow response to cortical spreading depression from hyperemia into hypoperfusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008 Jul;28(7):1369-76.
- Sukhotinsky I, Yaseen MA, Sakadzić S, Ruvinskaya S, Sims JR, Boas DA, Moskowitz MA, Ayata C. Perfusion pressure-dependent recovery of cortical spreading depression is independent of tissue oxygenation over a wide physiologic range. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010 Jun;30(6):1168-77.
- Sullivan PG, Keller JN, Bussen WL, Scheff SW. Cytochrome c release and caspase activation after traumatic brain injury. *Brain Res.* 2002 Sep 13;949(1-2):88-96.
- Sun Y, Calvert JW, Zhang JH. Neonatal hypoxia/ischemia is associated with decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration. *Stroke.* 2005 Aug;36(8):1672-8.
- Sun Y, Zhou C, Polk P, Nanda A, Zhang JH. Mechanisms of erythropoietin-induced brain protection in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004 Feb;24(2):259-70.
- Sun ZK, Yang HQ, Pan J, Zhen H, Wang ZQ, Chen SD, Ding JQ. Protective effects of erythropoietin on tau phosphorylation induced by beta-amyloid. *J Neurosci Res.* 2008 Oct;86(13):3018-27.
- Syková E, Jendelová P, Urdzíkova L, Lesný P, Hejcl A. Bone marrow stem cells and polymer hydrogels--two strategies for spinal cord injury repair. *Cell Mol Neurobiol.* 2006 Oct-Nov;26(7-8):1113-29.
- Talving P, Benfield R, Hadjizacharia P, Inaba K, Chan LS, Demetriades D. Coagulopathy in severe traumatic brain injury: a prospective study. *J Trauma.* 2009 Jan;66(1):55-61.
- Tazarourte K, Bensalah N, Rebillard L, Vigué B. 2008 ; 141-149 in MAPAR ed. [http://campus.neurochirurgie.fr/IMG/pdf\\_Epidemiologie\\_des\\_traumatismes\\_craniens.pdf](http://campus.neurochirurgie.fr/IMG/pdf_Epidemiologie_des_traumatismes_craniens.pdf)
- Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet.* 1974 Jul 13;2(7872):81-4.
- Teasdale TW, Engberg AW. Cognitive dysfunction in young men following head injury in childhood and adolescence: a population study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003 Jul;74(7):933-6.
- Teasdale TW, Engberg AW. Subjective well-being and quality of life following traumatic brain injury in adults: a long-term population-based follow-up. *Brain Inj.* 2005 Nov;19(12):1041-8.
- Temkin NR. Risk factors for posttraumatic seizures in adults. *Epilepsia.* 2003;44 Suppl 10:18-20.
- Teng YD, Choi H, Onario RC, Zhu S, Desilets FC, Lan S, Woodard EJ, Snyder EY, Eichler ME, Friedlander RM. Minocycline inhibits contusion-triggered mitochondrial cytochrome c release and mitigates functional deficits after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 2;101(9):3071-6.
- Thompson HJ, Lifshitz J, Marklund N, Grady MS, Graham DI, Hovda DA, McIntosh TK. Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation. *J Neurotrauma.* 2005 Jan;22(1):42-75.
- Thornhill S, Teasdale GM, Murray GD, McEwen J, Roy CW, Penny KI. Disability in young people and adults one year after head injury: prospective cohort study. *BMJ.* 2000 Jun 17;320(7250):1631-5.
- Thurman D, Guerrero J. Trends in hospitalization associated with traumatic brain injury. *JAMA.* 1999 Sep 8;282(10):954-7.
- Tollard E, Galanaud D, Perlberg V, Sanchez-Pena P, Le Fur Y, Abdennour L, Cozzone P, Lehericy S, Chiras J, Puybasset L. Experience of diffusion tensor imaging and 1H spectroscopy for outcome prediction in severe traumatic brain injury: Preliminary results. *Crit Care Med.* 2009 Apr;37(4):1448-55.
- Tomasevic G, Raghupathi R, Scherbel U, Wieloch T, McIntosh TK. Deletion of the p53 tumor suppressor gene improves neuromotor function but does not attenuate regional neuronal cell loss following experimental brain trauma in mice. *J Neurosci Res.* 2010 Nov 15;88(15):3414-23.
- Toulmond S, Rothwell NJ. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits neuronal damage caused by fluid percussion injury in the rat. *Brain Res.* 1995 Feb 13;671(2):261-6.
- Tshibanda L, Vanhauzenhuyse A, Boly M, Soddu A, Bruno MA, Moonen G, Laureys S, Noirhomme Q. Neuroimaging after coma. *Neuroradiology.* 2010 Jan;52(1):15-24.

- Uddin S, Kottegoda S, Stigger D, Platanius LC, Wickrema A. Activation of the Akt/FKHRL1 pathway mediates the antiapoptotic effects of erythropoietin in primary human erythroid progenitors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Aug 18;275(1):16-9.
- Vaccaro AR, Rihn JA, Saravanja D, Anderson DG, Hilibrand AS, Albert TJ, Fehlings MG, Morrison W, Flanders AE, France JC, Arnold P, Anderson PA, Friel B, Malfair D, Street J, Kwon B, Paquette S, Boyd M, Dvorak MF, Fisher C. Injury of the posterior ligamentous complex of the thoracolumbar spine: a prospective evaluation of the diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009 Nov 1;34(23):E841-7.
- Valable S, Francony G, Bouzat P, Fevre MC, Mahious N, Bouet V, Farion R, Barbier E, Lahrech H, Remy C, Petit E, Segebarth C, Bernaudin M, Payen JF. The impact of erythropoietin on short-term changes in phosphorylation of brain protein kinases in a rat model of traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010 Feb;30(2):361-9.
- van de Looij Y, Mauconduit F, Beaumont M, Valable S, Farion R, Francony G, Payen JF, Lahrech H. Diffusion tensor imaging of diffuse axonal injury in a rat brain trauma model. *NMR Biomed*. 2011 May 25.
- van der Kooij MA, Groenendaal F, Kavelaars A, Heijnen CJ, van Bel F. Combination of deferoxamine and erythropoietin: therapy for hypoxia-ischemia-induced brain injury in the neonatal rat? *Neurosci Lett*. 2009 Feb 20;451(2):109-13.
- van der Kooij MA, Groenendaal F, Kavelaars A, Heijnen CJ, van Bel F. Neuroprotective properties and mechanisms of erythropoietin in in vitro and in vivo experimental models for hypoxia/ischemia. *Brain Res Rev*. 2008 Nov;59(1):22-33.
- van der Naalt J, van Zomeren AH, Sluiter WJ, Minderhoud JM. One year outcome in mild to moderate head injury: the predictive value of acute injury characteristics related to complaints and return to work. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999 Feb;66(2):207-13.
- Verdonck O, Lahrech H, Francony G, Carle O, Farion R, Van de Looij Y, Remy C, Segebarth C, Payen JF. Erythropoietin protects from post-traumatic edema in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007 Jul;27(7):1369-76.
- Vespa PM, Nuwer MR, Nenov V, Ronne-Engstrom E, Hovda DA, Bergsneider M, Kelly DF, Martin NA, Becker DP. Increased incidence and impact of nonconvulsive and convulsive seizures after traumatic brain injury as detected by continuous electroencephalographic monitoring. *J Neurosurg*. 1999 Nov;91(5):750-60.
- Violet R, Ventré C, Leone M, Conforto C, Martin C. Erythropoietin measurements in severely traumatized patients. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2008 May;52(5):601-4.
- Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, Viviani B, Marinovich M, Cerami A, Coleman TR, Brines M, Ghezzi P. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med*. 2003 Sep 15;198(6):971-5.
- Villa P, van Beek J, Larsen AK, Gerwien J, Christensen S, Cerami A, Brines M, Leist M, Ghezzi P, Torup L. Reduced functional deficits, neuroinflammation, and secondary tissue damage after treatment of stroke by nonerythropoietic erythropoietin derivatives. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007 Mar;27(3):552-63. Epub 2006 Jul 12.
- Vincent JL, Baron JF, Reinhart K, Gattinoni L, Thijs L, Webb A, Meier-Hellmann A, Nollet G, Peres-Bota D; ABC (Anemia and Blood Transfusion in Critical Care) Investigators. Anemia and blood transfusion in critically ill patients. *JAMA*. 2002 Sep 25;288(12):1499-507.
- Vincent JL, Spapen HD, Creteur J, Piagnerelli M, Hubloue I, Diltoer M, Roman A, Stevens E, Vercammen E, Beaver JS. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of once-weekly subcutaneous epoetin alfa in critically ill patients: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Crit Care Med*. 2006;34(6):1661-7.
- Vitellaro-Zuccarello L, Mazzetti S, Madaschi L, Bosisio P, Fontana E, Gorio A, De Biasi S. Chronic erythropoietin-mediated effects on the expression of astrocyte markers in a rat model of contusive spinal cord injury. *Neuroscience*. 2008 Jan 24;151(2):452-66.
- Vitellaro-Zuccarello L, Mazzetti S, Madaschi L, Bosisio P, Gorio A, De Biasi S. Erythropoietin-mediated preservation of the white matter in rat spinal cord injury. *Neuroscience*. 2007 Feb 9;144(3):865-77.

- Viviani B, Bartesaghi S, Corsini E, Villa P, Ghezzi P, Garau A, Galli CL, Marinovich M. Erythropoietin protects primary hippocampal neurons increasing the expression of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurochem.* 2005 Apr;93(2):412-21.
- Voors AA, Belonje AM, Zijlstra F, Hillege HL, Anker SD, Slart RH, Tio RA, van 't Hof A, Jukema JW, Peels HO, Henriques JP, Ten Berg JM, Vos J, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ; HEBE III Investigators. A single dose of erythropoietin in ST-elevation myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2010 Nov;31(21):2593-600.
- Vos PE, Vogels OJ, Beems T, Thijssen HO, Zimmerman C. Mass volume measurement in severe head injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2000 Sep;69(3):406-7.
- Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke.* 2004 Jul;35(7):1732-7.
- Wheaton P, Mathias JL, Vink R. Impact of pharmacological treatments on cognitive and behavioral outcome in the postacute stages of adult traumatic brain injury: a meta-analysis. *J Clin Psychopharmacol.* 2011 Dec;31(6):745-57.
- Wheaton P, Mathias JL, Vink R. Impact of pharmacological treatments on outcome in adult rodents after traumatic brain injury: a meta-analysis. *J Psychopharmacol.* 2011 Dec;25(12):1581-99.
- Wilson J, Yao GL, Raftery J, Bohlius J, Brunskill S, Sandercock J, Bayliss S, Moss P, Stanworth S, Hyde C. A systematic review and economic evaluation of epoetin alpha, epoetin beta and darbepoetin alpha in anaemia associated with cancer, especially that attributable to cancer treatment. *Health Technol Assess.* 2007 Apr;11(13):1-202, iii-iv.
- Xenocostas A, Cheung WK, Farrell F, Zakszewski C, Kelley M, Lutynski A, Crump M, Lipton JH, Kiss TL, Lau CY, Messner HA. The pharmacokinetics of erythropoietin in the cerebrospinal fluid after intravenous administration of recombinant human erythropoietin. *Eur J Clin Pharmacol.* 2005 May;61(3):189-95.
- Xiong Y, Lu D, Qu C, Goussev A, Schallert T, Mahmood A, Chopp M. Effects of erythropoietin on reducing brain damage and improving functional outcome after traumatic brain injury in mice. *J Neurosurg.* 2008 Sep;109(3):510-21.
- Xiong Y, Mahmood A, Lu D, Qu C, Goussev A, Schallert T, Chopp M. Role of gender in outcome after traumatic brain injury and therapeutic effect of erythropoietin in mice. *Brain Res.* 2007 Dec 14;1185:301-12.
- Xiong Y, Mahmood A, Lu D, Qu C, Kazmi H, Goussev A, Zhang ZG, Noguchi CT, Schallert T, Chopp M. Histological and functional outcomes after traumatic brain injury in mice null for the erythropoietin receptor in the central nervous system. *Brain Res.* 2008 Sep 16;1230:247-57
- Xiong Y, Mahmood A, Meng Y, Zhang Y, Qu C, Schallert T, Chopp M. Delayed administration of erythropoietin reducing hippocampal cell loss, enhancing angiogenesis and neurogenesis, and improving functional outcome following traumatic brain injury in rats: comparison of treatment with single and triple dose. *J Neurosurg.* 2010 Sep;113(3):598-608.
- Xiong Y, Mahmood A, Qu C, Kazmi H, Zhang ZG, Noguchi CT, Schallert T, Chopp M. Erythropoietin improves histological and functional outcomes after traumatic brain injury in mice in the absence of the neural erythropoietin receptor. *J Neurotrauma.* 2010 Jan;27(1):205-15.
- Xiong Y, Mahmood A, Zhang Y, Meng Y, Zhang ZG, Qu C, Sager TN, Chopp M. Effects of posttraumatic carbamylated erythropoietin therapy on reducing lesion volume and hippocampal cell loss, enhancing angiogenesis and neurogenesis, and improving functional outcome in rats following traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 2011 Feb;114(2):549-59.
- Xu J, Rasmussen IA, Lagopoulos J, Håberg A. Diffuse axonal injury in severe traumatic brain injury visualized using high-resolution diffusion tensor imaging. *J Neurotrauma.* 2007 May;24(5):753-65.
- Yan EB, Hellewell SC, Bellander BM, Agyapomaa DA, Morganti-Kossmann MC. Post-traumatic hypoxia exacerbates neurological deficit, neuroinflammation and cerebral metabolism in rats with diffuse traumatic brain injury. *J Neuroinflammation.* 2011 Oct 28;8:147.
- Yatsiv I, Grigoriadis N, Simeonidou C, Stahel PF, Schmidt OI, Alexandrovitch AG, Tsenter J, Shohami E. Erythropoietin is neuroprotective, improves functional recovery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury. *FASEB J.* 2005 Oct;19(12):1701-3.

- Yu X, Shacka JJ, Eells JB, Suarez-Quian C, Przygodzki RM, Beleslin-Cokic B, Lin CS, Nikodem VM, Hempstead B, Flanders KC, Costantini F, Noguchi CT. Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development*. 2002 Jan;129(2):505-16.
- Zhang S, Carroll LJ, Cassidy JD, Paniak C. Factors influencing self-rated health in traffic-related mild traumatic brain injury. *J Rehabil Med*. 2009 Nov;41(13):1062-7.
- Zhang Y, Xiong Y, Mahmood A, Meng Y, Qu C, Schallert T, Chopp M. Therapeutic effects of erythropoietin on histological and functional outcomes following traumatic brain injury in rats are independent of hematocrit. *Brain Res*. 2009 Oct 19;1294:153-64.
- Ziebell JM, Morganti-Kossmann MC. Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*. 2010 Jan;7(1):22-30.
- Zimmermann KC, Green DR. How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Oct;108(4 Suppl):S99-103.