HAL
open science

L'érythropoïétine : un traitement de l'oedème cérébral de l'hypoxie cérébrale post-traumatiques

Pierre Bouzat

To cite this version:

Pierre Bouzat. L'érythropoïétine : un traitement de l'oedème cérébral de l'hypoxie cérébrale post-traumatiques. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENS005 . tel-00905688

HAL Id: tel-00905688

https://theses.hal.science/tel-00905688

Submitted on 18 Nov 2013

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.

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Modèles, méthodes et algorithmes en biologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Pierre BOUZAT

Thèse dirigée par **Jean-François PAYEN**
codirigée par **Emmanuel Barbier**

préparée au sein du **Grenoble Institut des Neurosciences**
dans **l'École Doctorale Ingénierie de la Santé, la Cognition et l'Environnement**

l'érythropoïétine : un traitement de l'œdème cérébral et de l'hypoxie cérébrale post - traumatiques

Thèse soutenue publiquement le **11 Février 2013**,
devant le jury composé de :

Monsieur Nicolas BRUDER
PU-PH, CHU de Marseille, Rapporteur
Monsieur Gérard AUDIBERT
PU-PH, CHU de Nancy, Rapporteur
Monsieur Jean-François PAYEN
PU-PH, CHU de Grenoble, Membre
Monsieur Pierre ALBALADEJO
PU-PH, CHU de Grenoble, Membre
Monsieur Emmanuel BARBIER
Directeur de recherche INSERM, Grenoble, Membre
Madame Myriam BERNAUDIN
Directrice de recherche CNRS, Caen, Membre
Monsieur Mauro ODDO
Maître d'enseignement et de recherche, Lausanne, Membre

Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France / Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP

Sommaire

Curriculum Vitae 6

Résumé 10

Abréviations 11

Préambule 16

Rappels bibliographiques 17

Chapitre I : L'œdème cérébral post-traumatique 17

1. Introduction 17

2. Physiopathologie de l'œdème cérébral post-traumatique 19

2.1. L'œdème vasogénique 19
2.2. L'œdème cellulaire 21
2.3. Le rôle des aquaporines 23

3. Conséquences cellulaires de l'œdème cérébral post-traumatique 26

3.1 Conséquences sur le couple neurone-astrocyte 26
3.2. Conséquences mitochondriales 27
3.3. La mort cellulaire 28

4. Evaluation de l'œdème cérébral post-traumatique 30

4.1 Méthodes de mesure de l'œdème cérébral post-traumatique 30
4.1.1 Méthodes de mesure IRM 30
4.1.2 Méthode ex vivo de mesure du contenu en eau intracérébral 32
4.2 Caractérisation de l'œdème cérébral diffus post-traumatique 33
4.3 Le modèle expérimental de TC par impact-accélération 35
4.3.1 Description initiale 35
4.3.2 Le modèle développé au laboratoire 36

5. Conclusion 37

Chapitre II : L'hypoxie cérébrale post-traumatique 38

1. Introduction 38

2. Paramètres de l'oxygénation cérébrale 39

2.1. Notion de PO_2 39
2.2. Cascade de l'oxygène 39
2.3. Notion de SO_2, OEF et $CMRO_2$ 40
2.4. Valeurs normales 42

3. L'ischémie et l'hypoxie cérébrale post-traumatiques 42

3.1. Quelles sont les valeurs de l'hypoxie et de l'ischémie cérébrales ? 43
3.2. Physiopathologie de l'hypoxie cérébrale post-traumatique 44
3.2.1. Approche macrovasculaire 45
3.2.2. Approche microvasculaire 46
3.2.3. Approche métabolique 47
3.3. Quelle est la valeur pronostique du monitorage de l'oxygénation cérébrale en clinique ? 48

4. Méthodes de mesure de l'oxygénation 49

4.1. Mesure de la pression en oxygène (PO_2) 49
4.1.1. Pression tissulaire en oxygène ($PtiO_2$) 49
4.1.2. Résonance paramagnétique électronique 51
4.1.3. Méthode IRM 52
4.1.4. Marqueurs histologiques de l'hypoxie 52
4.2. Mesure de la SO_2 53
4.2.1. La spectroscopie de proche infrarouge 53
4.2.2. La saturation veineuse jugulaire en oxygène 55
4.2.3. Tomographie photoaccoustique 56
4.3. Mesure de la SO_2 par l'effet BOLD 57
4.3.1. Caractère magnétique de l'hémoglobine 57
4.3.2. Principe de la méthode 57
4.3.3. Protocole d'acquisition 61
4.4. Mesure de la $CMRO_2$ 63
4.4.1. IRM ^{17}O 63
4.4.2. TEP ^{15}O 64
4.4.3. IRMf quantitative 64

5. Conclusion 65

Chapitre III : L'érythropoïétine et ses dérivés 66

1. L'érythropoïétine 66

1.1. Le rôle de l'érythropoïétine dans l'organisme 66
1.1.1. Effets hématologiques 67
1.1.2. Effets cérébraux 67
1.2. L'érythropoïétine exogène 69
1.3. Mécanismes cellulaires de la neuroprotection 70
1.4. Erythropoïétine exogène et neuroprotection 73
1.4.1. Etudes expérimentales 73

1.4.2. Etudes cliniques *76*
1.5. Les effets indésirables de l'érythropoïétine 77

2. L'érythropoïétine carbamylée 78

2.1. Principe de synthèse 78
2.2. Mécanismes cellulaires impliqués 79
2.3. Etudes expérimentales 80
2.3.1. Ischémie cérébrale *80*
2.3.2. Traumatisme crânien *80*
2.3.3. Cardioprotection *81*
2.3.4. Autres modèles expérimentaux *82*

3. Les autres dérivés de l'érythropoïétine 83

3.1. L'asialo-érythropoïétine 83
3.2. Séquence peptidique dérivée de l'érythropoïétine 84
3.3. L'érythropoïétine mutante S100E 85

4. Conclusion 86

Objectifs 87

Méthodologie générale 89

1. Animaux 89

2. Modèle de traumatisme crânien par impact-accélération 89

3. Préparation des animaux et protocoles de traitement 90
3.1. Préparation des animaux 90
3.2. Protocoles de traitement 91
3.2.1. Injection intra-veineuse *91*
3.2.2. Injection intra-ventriculaire *91*

4. Prélèvement sanguin du sinus longitudinal supérieur 92

5. Protocole IRM général 93

6. Evaluation de l'œdème cérébral 94
6.1. Evaluation de l'œdème cérébral par IRM de diffusion 94
6.2. Gravimétrie spécifique 95

7. Mesure de l'oxygénation cérébrale 96
7.1. Mesure de la lSO_2 par méthode BOLD 96
7.2. Mesure de la $PtiO_2$ 97

8. Mesure du débit sanguin cérébral par IRM 98

9. Microscopie électronique 98

10. Evaluations biochimiques 99

11. Evaluations immunohistochimiques 99
11.1. Immunomarquage de l'expression des caspases-3 99
11.2. Quantification de l'espression des caspases-3 100
11.3. Immunomarquage au pimonidazole 101

12. Mitochondries 102
12.1. Extraction des mitochondries 102
12.2. Quantification de la concentration en mitochondrie 102
12.3. Mesure de la Capacité de Rétention calcique 103

13. Tests neurocomportementaux 104

14. Analyse statistique 105

Résultats 106

Etude 1 108

Etude 2 124

Etude 3 139

Conclusion et perspectives 166

Références 171

Curriculum Vitae

Pierre BOUZAT
Né le 22 juin 1979 à Tarbes

N° Ordre des médecins : 38/9247
N° ADELI : 381092477, N° RPPS : 101 000 777 25

FONCTIONS HOSPITALIERES :

2012 : Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier
Université Joseph Fourier - Pôle Anesthésie-Réanimation, Grenoble

2009-2012 : Chef de Clinique à la faculté – Assistant des hôpitaux
Université Joseph Fourier - Pôle Anesthésie-Réanimation, Grenoble

2003-2009 : Interne des hôpitaux de Grenoble.

TITRES ET DIPLOMES UNIVERSITAIRES :

2009-2012 : Thèse d'université en cours (4ème Année) : Ecole Doctorale Ingénierie de la Santé et de la Cognition et l'Environnement, Collège des écoles doctorales de Grenoble. Doctorant au Grenoble Institut des Neurosciences (GIN), Equipe 5. Soutenance prévue le 11 Février 2013.

2010-2011 : DU de pédagogie médicale, Université Joseph Fourier, Grenoble.

2009 : Doctorat en médecine, Université Joseph Fourier, Grenoble.
DES Anesthésiologie-Réanimation, Université Joseph Fourier, Grenoble.

2008-2009 : DU d'exploration hémodynamique par ultrasons en anesthésie réanimation et Urgence**,** Université Claude Bernard de Lyon.

2006-2007 : Master Recherche Ingénierie de la Santé et du Médicament
Approche Spatio-Temporelle des Systèmes Vivants
Option : Imagerie Morphologique, Fonctionnelle et Métabolique
Mention Très Bien, Université Joseph Fourier, Grenoble.

1998-2003 : Premier et deuxième cycle des études médicales, Faculté de médecine Toulouse - Rangueil, Université Paul Sabatier Toulouse III

PUBLICATIONS:

Publications avec comité de lecture international :

1. 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 ; 30 : 361-9.
2. **Bouzat P**, Francony G, Brun J, Lavagne P, Picard J, Broux C, Declety P, Jacquot C, Albaladejo P, Payen JF. Detecting traumatic internal carotid artery dissection using transcranial Doppler in head-injured patients. *Intensive Care Med*. 2010 ; 36 :1 514-20.
3. **Bouzat P**, Francony G, Fauvage B, Payen JF. Transcranial Doppler pulsatility index for initial management of brain-injured patients. *Neurosurgery* 2010 ; 67 : E1863-4.
4. **Bouzat P**, Francony G, Declety P, Genty C, Kaddour A, Bessou P, Brun J, Jacquot C, Chabardes S, Bosson JL, Payen JF. Transcranial. Doppler to screen on admission patients with mild to moderate traumatic brain injury. *Neurosurgery* 2011 ; 68 : 1603-10.
5. **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 ; 39 : 2099-105.
6. Payen JF, Dupuis C, Trouve-Buisson T, Vinclair M, Broux C, **Bouzat P**, Genty C, Monneret D, Faure P, Chabre O, Bosson JL. Corticoid following etomidate in critical ill patients: a randomized controlled trial. *Crit Care Med* 2012 ; 40 : 29-35.
7. Hyacinthe AC, Broux C, Francony G, Genty C, **Bouzat P**, Jacquot C, Albaladejo P, Ferretti G, Bosson JL, Payen JF. Diagnostic accuracy of ultrasonography in the acute assessment of common thoracic lesions after trauma. *Chest.* 2012 ; 141 : 1177-83.
8. Brun PM, Chenaitia H, Dejesus I, Bessereau J, Bonello L, **Bouzat P**. Ultrasound to perimortem caesarean delivery in prehospital settings. *Injury*. 2012. Sous presse.
9. **Bouzat P**, Millet A, Boue Y, Trouve-Buisson T, Gaide-Chevronay L, Barbier EL, Payen JF. Changes in brain tissue oxygenation after treatment of diffuse traumatic brain injury by erythropoietin. *Crit Care Med*. 2012. Accepté.
10. **Bouzat P**, Walther G, Rupp T, Doucende G, Payen JF, Levy P, Vergès S. Time course of asymptomatic interstitial pulmonary oedema at high altitude. *Resp Physiol Neurobiol*. 2012. Accepté.

Publications avec comité de lecture national :

1. **Bouzat P**, Broux C, Soriano E, Pavese P, Croizé J, Stahl JP, Jacquot C. Dermohypodermite cervicale à Streptococcus Pneumoniae chez un patient diabétique. *Med Mal Infect*. 2007 ; 37 : 290-2.
2. **Bouzat P**, Francony G, Declety P, Brun J, Kaddour A, Renversez JC, Jacquot C, Payen JF. Peut-on predire l'aggravation neurologique des

patients traumatises craniens mineurs et moderes par le dosage sanguin de la proteine S-100beta? *Ann Fr Anesth Reanim* 2009 ; 28 : 135-9.

3. Francony G, Declety P, **Bouzat P**, Picard J, Payen JF. Les dangers de l'hypothermie therapeutique. *Ann Fr Anesth Reanim* 2009 ; 28 : 371-4
4. Grèze J, **Bouzat P**, Grand S, Payen JF, Detante O. Angiopathie amyloïde cérébrale : un diagnostic difficile en réanimation. *Ann Fr Anesth Reanim* 2011 ; 30 : 933-6.
5. Francony G, **Bouzat P**, Picard J, Fevre MC, Gay S, Payen JF. Hyperoxie normobarique chez le patient cérébro-lésé. *Ann Fr Anest Réanim* 2012 ; 31 : 224-7.
6. Payen JF, Isnardon S, Lavolaine J, **Bouzat P**, Vinclair M, Francony G. La pupillométrie en anesthésie-réanimation. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2012 ; 31:155-9
7. Francony G, **Bouzat P**, Payen JF. Monitorage par spectrométrie de proche infrarouge en neuroréanimation. *Ann Fr Anesth Reanim*. 2012 ; 31 : 133-6.
8. Cuisinier A, Schilte C, Declety P, Baudrant M, Picard J, Berger K, **Bouzat P**, Gay S, Falcon D, Bosson JL, Payen JF, Albaladejo P. Evaluation d'un labyrinthe pédagogique pour l'enseignement de la traumatologie grave. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2012. Sous presse
9. Spadoni T, Niermont B, Brun J, Bach V, **Bouzat P**. Syndrome de détresse respiratoire d'origine traumatique: procédure de sauvetage au sein d'un réseau de soin en traumatologie. *Ann Fr Anesth Reanim*. 2012. Sous presse

CONFERENCES SUR INVITATION:

1. Atelier pratique doppler trans-crânien. *50ème Congrès National d'Anesthésie et de Réanimation.* Paris, 24-27 Septembre 2008.
2. Atelier pratique doppler trans-crânien. *52ème Congrès National d'Anesthésie et de Réanimation.* Paris, 24-27 Septembre 2010.
3. Therapeutic Hypothermia. 7ème *Congrès annuel de la Société d'Anesthésie de l'Etat de Sao Paolo (SAESP)*. Sao Paolo, Brésil, 3-5 Juin 2010.
4. Transcranial doppler. 7ème *Congrès annuel de la Société d'Anesthésie de l'Etat de Sao Paolo (SAESP)*. Sao Paolo, Brésil, 3-5 Juin 2010.
5. Atelier pratique doppler transcrânien. *17ème Congrès régional ICAR*, Lyon, 26-27 Novembre 2010.
6. Atelier pratique doppler trans-crânien. *53ème Congrès National d'Anesthésie et de Réanimation.* Paris, 21-24 Septembre 2011.
7. Atelier pratique doppler transcrânien. *54ème Congrès National d'Anesthésie et de Réanimation.* Paris, 19-22 Septembre 2012.
8. Doppler trans-crânien et cervical. *54ème Congrès National d'Anesthésie et de Réanimation.* Paris, 19-22 Septembre 2012
9. Atelier pratique échographie à l'usage de l'urgentiste. *54ème Congrès National d'Anesthésie et de Réanimation.* Paris, 19-22 Septembre 2012.
10. Intérêt du doppler trans-crânien en médecine d'urgence. *9ème Forum de l'Urgence*. Nimes, 29 Novembre 2012.

RECOMPENSES ET APPELS D'OFFRE OBTENUS :

1. *Vivier de la recherche médicale* 2006 (Faculté de médecine de Grenoble): Effet neuroprotecteur de la CEpo dans un modèle d'œdème cérébral post-traumatique.
2. 1er prix *concours des résidents* dans la catégorie étude clinique (SFAR 2007) : Le Doppler transcrânien comme aide au dépistage de l'aggravation neurologique après traumatisme crânien mineur et modéré.
3. 1er prix *Jeune chercheur en anesthésie-réanimation Rhône-Alpes* (ICAR 2007) : Le Doppler transcrânien comme aide au dépistage de l'aggravation neurologique après traumatisme crânien mineur et modéré.
4. 1er prix *jeune chercheur en anesthésie-réanimation Rhône-Alpes* (ICAR 2008) : Effets de l'érythropoïétine carbamylée dans un modèle d'œdème cérébral post-traumatique.
5. *Soutien financier de l'association « Gueules cassées »* (2011) : cartographie IRM de l'oxygénation post-traumatique (41 000 Euros).
6. *Bourse de l'association « Gueules cassées »* (2012) : Rôle neuroprotecteur du lactate de sodium molaire chez les patients traumatisés crâniens graves (17400 Euros).

SOCIETE SAVANTE :

Membre de la Société Française d'Anesthésie Réanimation depuis 2009.

Résumé : L'œdème cérébral et l'hypoxie cérébrale post-traumatiques sont les acteurs principaux de l'apparition des lésions ischémiques secondaires. L'erythropoïétine (Epo) sous sa forme recombinante humaine possède une activité anti-oedémateuse dans un modèle expérimental de TC diffus. Son action sur l'hypoxie cérébrale post-traumatique reste néammoins méconnue. De plus, les effets indésirables hématologiques de l'Epo ont conduit à la synthèse de dérivés de l'Epo ne possèdant pas d'activité hématopoïétique comme l'érythropoïetine carbamylée (CEpo). Dans ce contexte, mon travail de thèse a eu pour but d'évaluer les propriétés de l'Epo et de la CEpo dans le modèle de TC diffus. Un traitement intraveineux par CEpo à la dose de 50 µg/Kg a ainsi permis de diminuer précocemment l'œdème cérébral post-traumatique évalué *in vivo* par IRM de diffusion et *ex vivo* par gravimétrie spécifique. Cette propriété a impliqué l'inhibition de la phosphorylation de la voie Erk et s'est accompagnée de l'amélioration des fonctions motrices et cognitives jusqu'à 10 jours après le TC. Après une étude de validation sur des rats sains soumis à différentes conditions d'oxygénation, une méthode de mesure IRM de la saturation locale en oxygène (lSO_2) cérébrale combinant l'effet BOLD avec la mesure du volume sanguin cérébral a montré une diminution de l'oxygénation cérébrale post-traumatique. Cette hypoxie cérébrale n'était pas en lien avec une diminution du débit sanguin cérébral attestée par méthode de premier passage d'un agent de contraste. Un collapsus des capillaires cérébraux était par ailleurs retrouvé en microscopie électronique. L'Epo à la dose de 5000 UI/Kg a été capable de restaurer l'oxygénation cérébrale en diminuant l'œdème astrocytaire péricapillaire. L'ensemble de ce travail a permis d'établir les bénéfices d'un traitement par Epo ou par CEpo sur l'œdème cérébral et l'hypoxie cérébrale post-traumatiques.
Mots clés : Traumatisme crânien, œdème cérébral, hypoxie cérébrale, érythropoïétine, érythropoïétine carbamylée, IRM, oxygénation.

Abstract: Post-traumatic brain oedema and brain hypoxia play a key role for the development of secondary ischaemic lesions. Erythopoïetin (Epo) is an anti-oedematous agent in the impact-acceleration model. However its action on brain hypoxia remains unkonwn. Neuroprotective derivatives of Epo that lack haematopoïétic properties, like carbamylated Epo (CEpo), have been developped to counter Epo side effects. In this context, our study aimed to assess the effect of Epo and CEpo on post-traumatic diffuse brain oedema and brain oxygenation. CEpo (50 µg/Kg) decreased brain oedema assessed by diffusion-weighted MRI and specific gravimetry 6 hours after the trauma. The anti-oedematous effect of CEpo was linked to Erk inhibition and was associated with an improvement of cognitive and motor functions, evaluated until 10 days after the insult. MRI using the combination of BOLD contrast and blood volume fraction measurement demonstrated a decrease of local brain oxygenation in our model, without franck ischemia (measurement of mild transit time by a first passage method). Epo (5000 UI/Kg) improved brain oxygenation by decreasing post-traumatic cerebral capillaries collapse due to astrocytic end-foot swelling. All these results demonstrated that Epo and CEpo could be seen as promising neuroprotective agents in traumatic brain injury.
Key words: Traumatic brain injury, cerebral oedema, brain hypoxia, erythropoïetin, carbamylated erythropoietin, MRI, oxygenation

Abréviations

2D	2 dimensions
3D	3 dimensions
ACM	Artère cérébrale moyenne
ADC	*Apparent diffusion coefficient*
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIF	*Apoptosis inducing factor*
AMPA	Acide a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionique
AQP	Aquaporine
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATP	Adenosine triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
B_0	Champ statique
BCL	*B-cell leukaemia/lymphoma*
βcR	Récepteur commun Beta
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BOLD	*Blood oxygen level dependant*
BSA	*Bovine serum albumine*
BVf	*Blood volume fraction*
CAIX	Anhydrase carbonique IX
Caspase	*Cysteinyl aspartate-specific proteinase*
CBF	*Cerebral blood flow*
CBV	*Cerebral blood volume*
CD	*Cluster of differentiation*
CEI	Contenu en eau intra-cérébral
CEpo	Erythropoïétine carbamylée
$CMRO_2$	*Cerebral metabolic rate of oxygen*
COX	Cyclo-oxygénase
CRC	Capacité de rétention calcique

CSA	Ciclosporine A
Cte	Constante
DMSO	Diméthylsulfoxide
DPF	*differential pathlength factor*
DSC	Débit sanguin cérébral
DTC	Doppler trans-crânien
$\Delta \chi_0$	Différence de susceptibilité magnétique
EEG	Electroencéphalographie
EF-5	Etanidazole penta-fluoride
EGTA	*Ethylene glycol tetraacetic acid*
EPI	*Echo-planar-imaging*
Epo	Erythropoïétine
Erk	*Extracellular-signal- regulated kinase*
$EtCO_2$	*End-tidal CO_2*
FETA	^{18}F-fluoroérythronitroimidazole
FIO_2	Fraction inspirée d'oxygène
^{18}F-MISO	Fluoromisonidazole
FOV	*Field of view*
F(t)	inhomogénéités macroscopiques de champ
G	Gauge
GCS	*Glasgow Coma Scale*
GLUT1	Transporteur de glucose 1
G/M	Glutamate/malate
GRB	*Growth factor receptor-binding*
HbO_2	Hémoglobine oxygénée
Hb	Hémoglobine
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HIF	*Hypoxia inductible factor*

Hct	Hématocrite
HSA	Hémorragie sous-arachnoïdienne
HTIC	Hypertension intra-crânienne
IGF	*Insulin growth factor*
IL-1β	Interleukine-1β
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IRMf	Imagerie fonctionnelle par résonance magnétique
JAK	Janus Tyrosine kinase
kDa	KiloDalton
KO	*Knock-out*
LAD	Lésion axonale diffuse
LCR	Liquide céphalo-rachidien
lSO_2	Saturation locale en oxygène
MAO	Monoamine oxydase
MAPK	ras-Mitogen-Activated Protein Kinase
MGE	Séquence d'écho de gradient multiple
mmHg	Millimètre de mercure
MMP	Métalloprotéase de la matrice
MOPS	*3-(N-morpholino) propanesulfonic acid*
mPTP	Pore mitochondrial de transition de perméabilité
MTT	*Mild transit time*
NF- κB	*Nuclear factor kappa B*
NIRS	*Near infrared spectroscopy*
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NO	Monoxyde d'azote
NOS	NO synthase
OACM	Occlusion de l'artère cérébrale moyenne
OC	Œdème cérébral

OEF	*Oxygen extraction fraction*
PAM	Pression artérielle moyenne
PaO_2	Pression partielle artérielle en oxygène
$PaCO_2$	Pression partielle artérielle en dioxyde de carbone
PBS	Tampon phosphate salin
PDGF	*Platelet derived growth factor*
PET	*Positon emission tomography*
PIC	Pression intra-crânienne
PI3K	Phophatidylinositol 3-Kinase
PLC	Proteine lipase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
PO_2	Pression partielle en oxygène
PPC	Pression de perfusion cérébrale
ppm	Partie par million
$PtiO_2$	Pression tissulaire en oxygène
R_1	Constante de relaxation longitudinale
R_2	Constante de relaxation transversale
R-Epo	Récepteur à l'érythropoïétine
Rh-Epo	Erythropoïétine recombinante humaine
RLs	Radicaux libres
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
ROI	*Region of interest*
RPE	Résonance paramagnétique électronique
rSO_2	Saturation régionale en oxygène
SaO_2	Saturation artérielle en oxygène
SHC	Src Homology Containing
SNC	Système nerveux central
SO_2	Saturation en oxygène
SOS-1	*Son of Sevenless-1*
SpGv	Spécificité gravimétrique
SsO_2	Saturation veineuse du sinus longitudinal supérieur

SSS	*Superior Sagital Sinus*
STAT	*Signal Transducer and Activator of Transcription*
SvO_2	Saturation veineuse en oxygène
$SvjO_2$	Saturation veineuse jugulaire en oxygène
T	Tesla
T_1	Temps de relaxation longitudinal
T_2	Temps de relaxation transversal
TC	Traumatisme crânien
TE	temps d'écho
TEP	Tomographie par émission de positons
TTM	Temps de transit moyen
TNFα	Facteur nécrosant des tumeurs α
TR	Temps de répétition
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
U0126	1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis (2-aminophenylthio) butadiene
USPIO	*Ultrasmall superparamagnetic iron oxide*
VEGF	*Vascular Endothélial Growth Factor*
VSC	Volume sanguin cérébral

Préambule

Ce travail a été mené au sein de l'équipe 5 « neuroimagerie fonctionnelle et perfusion cérébrale » de l'Institut des Neurosciences de Grenoble (GIN) sous la supervision conjointe du Pr Jean-François Payen et du Dr Emmanuel Barbier. Cette équipe travaille au développement de techniques innovantes d'acquisition et d'analyse en imagerie et spectroscopie par résonance magnétique nucléaire et sur leurs applications précliniques et cliniques en neurosciences. Une des thématiques de recherche développée par cette équipe porte sur l'étude du traumatisme crânien. Le présent travail a pour objet l'évaluation d'une thérapeutique neuroprotectrice, l'érythropoïétine et son dérivé carbamylé, pour le traitement de l'œdème cérébral et de l'hypoxie cérébrale post-traumatiques grâce à des techniques d'imagerie par résonance magnétique nucléaire. L'évaluation pré-clinique de traitements neuroprotecteurs est une étape indispensable avant la mise en place d'essais cliniques. La compréhension des phénomènes physiopathologiques liés à la neuroprotection constitue également un enjeu important pour la gestion des patients victimes d'un traumatisme crânien.

CHAPITRE I

L'œdème cérébral post-traumatique

1. Introduction

Le traumatisme crânien (TC) constitue un problème majeur de santé publique puisque cette pathologie est actuellement l'une des premières causes de mortalité et de morbidité chez l'adulte jeune en Europe et aux Etats-Unis (Boto, Gomez et al. 2009). L'hétérogénéité de sa gravité allant de la simple consultation pour TC mineur à l'hospitalisation pour TC grave en réanimation (Abelson-Mitchell, 2008) rend difficile l'interprétation des différentes études épidémiologiques. Classiquement, le score de Glasgow (GCS, Teasdale and Jennett 1974), s'étendant de 3 à 15, permet de classer les patients victimes de TC en 3 catégories : les TC mineurs (GCS 14-15), les TC modérés (GCS 9-13) et les TC graves (GCS 3-8). Cette classification n'est cependant pas suffisante pour estimer la gravité des TC puisqu'une proportion non négligeable des patients avec un TC mineur ou modéré est susceptible de s'aggraver, constituant une catégorie de patients particulière appelée « talk and die patients » (Davis, Kene et al. 2007).

En Europe, l'incidence des TC est environ 235 pour 100 000 patients hospitalisés, avec une mortalité moyenne d'environ 15 pour 100 000 patients hospitalisés. Le côut financier pour la prise en charge des TC a été estimé à plus de 60 milliards de dollars en 2012 (Olesen, Gustavsson et al. 2012). Aux Etats-Unis, l'incidence annuelle des TC dans les services d'urgence atteint 403 cas pour 100 000 patients non hospitalisés et 85 cas pour 100 000 patients hospitalisés. La répartition des TC est la suivante : 80 à 94% de TC mineur, 3 à 11% de TC modéré et 3 à 9% de TC grave (Tagliaferri, Compagnone et al. 2006). En France, dans la région Ile-de-France, les TC graves sont constitués par moitié par des sujets de moins de 42 ans (Matéo, Lescot et al. 2010). Les TC sont plus fréquents chez les hommes (Abelson-Mitchell, 2008). Les causes principales de TC sont représentées par les accidents de la circulation, les chutes et les agressions (Tagliaferri, Compagnone et al. 2006; Abelson-Mitchell

2008). L'intoxication alcoolique est souvent associée dans 24 à 51% des TC (Tagliaferri, Compagnone et al. 2006).

Malgré des efforts importants entrepris depuis des années par les équipes médicales, la mortalité des patients ayant un TC grave (score de Glasgow inférieur à 9 à l'admission) reste comprise entre 30 et 50%, et seulement 20% des patients n'auront pas de séquelles à long terme (Thornhill, Teasdale et al. 2000; Stocchetti, Penny et al. 2001).

Au moment du traumatisme, les forces mises en jeu sur la boîte crânienne et son contenu sont responsables de lésions cérébrales immédiates appelées lésions primaires. Outre les fractures du crâne et les hématomes extra- et sous-duraux, les lésions cérébrales primaires se traduisent par des zones de contusions hémorragiques, d'hématomes intracérébraux, et/ou de lésions axonales diffuses (LAD). Ces lésions primaires peuvent aboutir à des lésions ischémiques irréversibles (Graham et Adams, 1971). Ces lésions peuvent aboutir également à la formation d'un œdème cérébral (OC) post-traumatique par une cascade physiopathologique complexe.

L'œdème cérébral joue un rôle central dans la physiopathologie du TC et de ses complications. On peut, en effet, le représenter comme une augmentation du contenu en eau intracérébrale aboutissant à une augmentation du volume tissulaire (Unterberg, Stover et al. 2004). La boîte crânienne étant une structure rigide inextensible, toute augmentation de volume de son contenu se traduit par une augmentation de la pression intracrânienne (PIC). Cette hypertension intracrânienne (HTIC) peut avoir plusieurs conséquences directes :

- altération de la perfusion cérébrale : la perfusion cérébrale peut être estimée par la différence entre la pression artérielle moyenne (PAM) et la PIC. Cette différence représente la pression de perfusion cérébrale (PPC). En cas d'HTIC liée à un oedème cérébral, la réduction de la PPC conduit à une ischémie cérébrale.
- déplacement et/ou compression des structures cérébrales : l'œdème diffus ou local peut comprimer ou déplacer des structures cérébrales, créant une ischémie par engagement cérébral.

L'ensemble de ces mécanismes aboutit à l'apparition de zones ischémiques qui aggravent les lésions cérébrales primaires (Payen, Fauvage et al. 2001).

2. Physiopathologie de l'oedème cérébral post-traumatique

La physiopathologie de la constitution de l'OC n'est pas encore complètement élucidée, il faut distinguer néanmoins deux types d'OC : l'oedème vasogénique et l'oedème cytotoxique (Marmarou, 2003; Kimelberg, 2004; Unterberg, Stover et al. 2004).

2.1 L'Œdème vasogénique

Au niveau cérébral, les échanges entre les compartiments intravasculaire et interstitiel sont soumis à une forte régulation, grâce à la présence d'une structure anatomique unique, la barrière hématoencéphalique (BHE). Cette BHE est composée des cellules endothéliales, de la membrane basale et des pieds astrocytaires (Kimelberg, 2004). L'imperméabilité est assurée au niveau de l'endothélium par la présence de jonctions serrées (*tight junctions*) entre les cellules interdisant les mouvements moléculaires passifs. Les mouvements au travers de la BHE se font grâce à différentes structures cellulaires, dont les canaux ioniques, les transporteurs (glucose, lactate, phénylalanine) ou encore les aquaporines (AQP) de type 4 (Kimelberg, 2004) (figure 1).

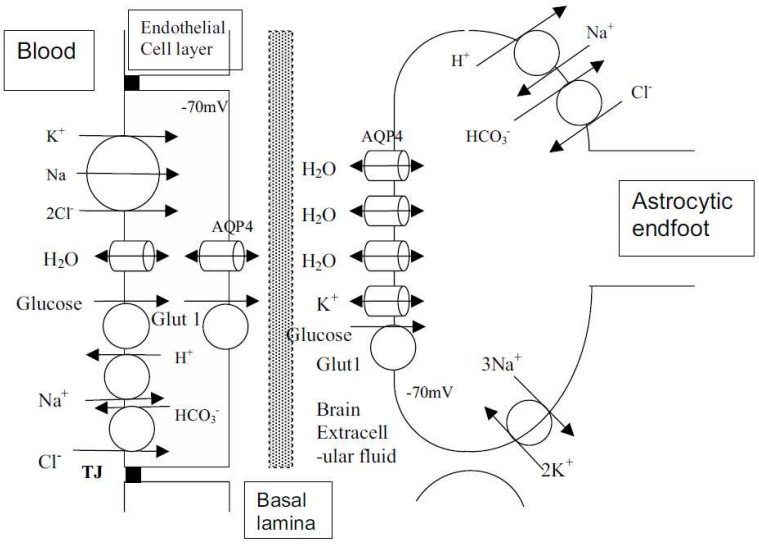


Figure 1 : Mouvements moléculaires à travers la BHE (d'après Kimelberg, 2004)

Dans les suites d'un TC, on observe une augmentation du contenu en eau intracellulaire. Cette augmentation suppose un passage obligatoire d'eau du secteur intravasculaire vers le secteur interstitiel, donc une augmentation de la perméabilité de la BHE (Barzo, Marmarou et al. 1996; Hartl, Medary et al. 1997).

La neuro-inflammation par l'intermédiaire de la sécrétion de l'interleukine-1β et de la métalloprotéase de la matrice -9 (MMP-9) a un rôle primordial dans l'ouverture de la BHE (Shigemori, Katayama et al. 2006). Celle-ci est secondaire à l'infiltration des cellules sanguines, l'activation des microglies et des astrocytes au sein du tissu cérébral lésé. Les cellules activées génèrent la sécrétion post-traumatique de médiateurs cytotoxiques et/ou neurotrophiques comme les cytokines, l'interleukine-1β (IL-1β) et le facteur nécrosant des tumeurs (TNFα). La neuro-inflammation post-TC est caractérisée également par une augmentation de l'expression des chimiokines, de molécules d'adhésion, et d'enzymes pro-inflammatoires (Morganti-Kossmann, Satgunaseelan et al. 2007). La sécrétion des kinines par le tissu cérébral lésé, peut être responsable d'une perturbation de la microcirculation et d'une rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) participant également à la formation de l'œdème cérébral vasogénique.

Le stress oxydant interviendrait également dans la formation de l'œdème vasogénique en activant les métalloprotéases de la matrice susceptibles de dégrader la membrane basale et les composants de la matrice extra-cellulaire de la BHE (Haorah, Ramirez et al. 2007). Les radicaux libres (RLs) sont des espèces hautement réactives produites principalement lors de la respiration et du métabolisme cellulaire. Lors d'une production excessive de RLs, la capacité de défense anti-oxydante se trouve dépassée et/ou inhibée. Les RLs peuvent être synthétisés à plusieurs niveaux : par les mitochondries suite à l'augmentation des concentrations intracellulaires de Ca^{2+}, à partir des phospholipides membranaires, par l'activation des monoamines oxydases (MAO), des cyclo-oxygénases (COX), des NO synthases (NOS), et par des cellules inflammatoires, telles que les macrophages et les polymorphonucléaires neutrophiles. Par ailleurs, le monoxyde d'azote (NO) produit massivement par les NOS peut se combiner aux anions superoxyde

($O2^-$) pour former des anions peroxynitrite ($ONOO^-$), qui sont de puissants agents du stress oxydant (Besson, 2009).

L'ensemble de ces processus post-traumatiques induit ainsi la perte de la perméabilité des jonctions serrées qui aboutit finalement à l'accumulation extra-vasculaire des macro constituants plasmatiques (Payen, Fauvage et al. 2003).

2.2 L'Œdème cellulaire

L'œdème cellulaire concerne aussi bien les cellules gliales que les neurones (Unterberg, Stover et al. 2004), néanmoins les astrocytes sembleraient plus sensibles au développement de cet œdème et à ses conséquences (Chen et Swanson, 2003). Son apparition débute à proximité immédiate de la BHE, au niveau des pieds astrocytaires (Chen et Swanson, 2003) (figure 2). Ce gonflement cellulaire concerne cependant l'ensemble des éléments cellulaires : neurones, cellules gliales et les cellules endothéliales, aboutissant à une défaillance énergétique des cellules concernées. Cette défaillance a pour conséquences :

- un dysfonctionnement des pompes ioniques actives, entraînant une augmentation de la perméabilité membranaire et un passage intracellulaire de substances osmotiquement actives (Unterberg, Stover et al. 2004).
- une glycolyse anaérobie avec augmentation de la production d'acide lactique aboutissant à une acidose intracellulaire (Marmarou 1992) ; cette acidose entraîne l'activation de transporteurs anioniques participant également à l'élévation de la charge osmotique intracellulaire (Ringel, Chang et al. 2000).
- une élévation du K^+ extracellulaire initialement compensée par les astrocytes dont le fonctionnement n'est pas altéré, qui aboutit à l'élévation de K^+ intracellulaire et au gonflement cellulaire de ces astrocytes (Chen et Swanson, 2003).
- une dépolarisation membranaire due à la perte de K^+ intracellulaire (défaut de fonctionnement de la pompe Na/K-ATPase dépendante) conduisant à des entrées massives de Ca^{2+} via les canaux voltages dépendants.

L'excitotoxicité impliquant la libération d'acides aminés excitateurs, tels que le glutamate, est capable d'entraîner l'afflux de Na^+ et Ca^{2+} vers l'espace intracellulaire. La libération précoce et progressive post-traumatique de glutamate a pu être mise en évidence par microdialyse cérébrale chez des patients et dans différents modèles expérimentaux de TC (Farkas et Povlishock 2007). Le défaut des pompes présynaptiques et l'exocytose mise en jeu par le Ca^{2+} contribuent à la libération initiale de glutamate dépendante de la dépolarisation neuronale. L'excitotoxicité, selon des théories plus récentes, dépendraient de modifications des récepteurs post-synaptiques du glutamate induites par le TC ainsi que de la localisation de l'afflux de Ca^{2+}. Il existe 3 types de récepteur au glutamate : le récepteur AMPA (acide a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionique), le récepteur NMDA (N-methyl-D-aspartate) et le recepteur métabotropique au glutamate (Park, Bell et al. 2008).

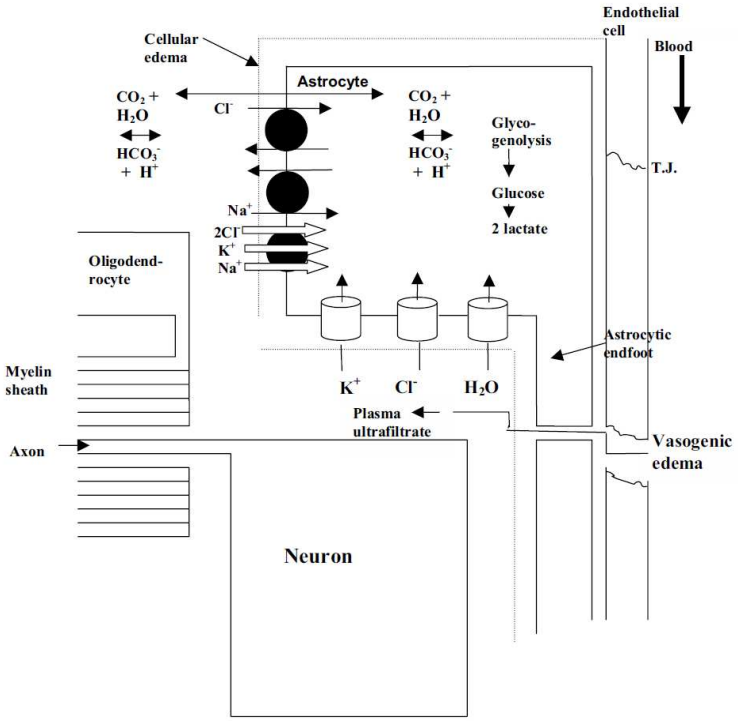


Figure 2 : Représentation schématique de la constitution de l'œdème vasogénique et de l'œdème cytotoxique d'après Kimelberg et al., 2004.

2.3 Rôle des aquaporines dans l'œdème cérébral post-traumatique

Les aquaporines (AQP) sont une classe de protéines membranaires qui forment des « pores » perméables aux molécules d'eau dans les membranes biologiques. Les AQP permettent le passage de l'eau de part et d'autre de la membrane de façon bidirectionnelle selon les gradients osmotiques. La première AQP a été identifiée en 1988 sur des globules rouges (AQP 1) (Denker, Smith et al. 1988). Depuis au moins 13 protéines ont été identifiées chez les mammifères (Verkman, 2009).

Les AQP sont des tétramères de 250 à 300 acides aminés et chaque monomère de poids moléculaire de 28kDa possède son canal à l'eau. On distingue deux groupes d'AQP : celles qui ne transportent que de l'eau et celles qui transportent également du glycérol et d'autres petites molécules telle l'acide lactique que l'on nomme aquaglycéroporines (AQP3, 7 et 9). On ne connait pas d'inhibiteurs spécifiques des AQP et nos connaissances actuelles sur les fonctions des AQP proviennent de souris KO pour les AQP. Elles sont notamment impliquées dans les processus de concentrations urinaires, d'accumulation de graisse, de migration cellulaire, d'infiltration tumorale et d'œdème cérébral (Saadoun, Tait et al. 2009).

Au niveau cérébral, l'AQP la plus abondante est l'AQP4. On la retrouve au niveau des pieds astrocytaires autour des microvaisseaux, au niveau de la pie-mère et au niveau épendymaire (Papadopoulos et Verkman, 2007). Ces trois localisations (figure 3) correspondent au lieu d'échange entre le parenchyme cérébral et le compartiment liquidien ce qui suggère que les AQP4 contrôle l'entrée et la sortie d'eau au sein du parenchyme cérébral. Deux autres AQP sont exprimées au niveau du SNC : l'AQP1 et l'AQP9. L'AQP1 joue notamment un rôle dans la formation du LCR (Oshio, Binder et al. 2005), le rôle de AQP9 reste pour le moment inconnu.

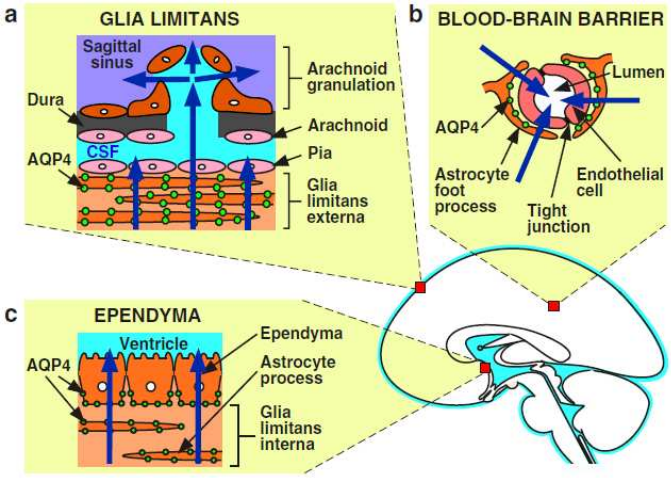


Figure 3: voies d'élimination de l'eau au cours de l'œdème cérébral, toutes sont riches en AQP4 (d'après Papadopoulos et al, Pediatr Nephrol, 2007)

L'expression des AQP est modifiée en condition pathologique. L'AQP4 est surexprimée dans les suites de lésions cérébrales non traumatiques ou traumatiques chez le rat (figure 4) (Ding, Kreipke et al. 2009). Celle-ci favoriserait l'entrée d'eau intracellulaire et donc l'œdème cellulaire.

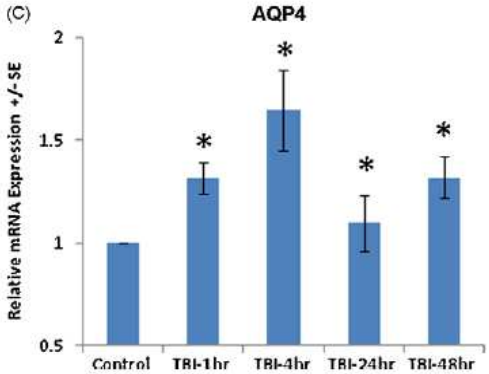


Figure 4: expression du gène de l'AQP4 étudié par Real Time PCR (d'après Ding et al, Neuroscience Letters, 2009)

Chez des souris KO pour l'AQP4, Manley et al en 2000 (Manley, Fujimura et al. 2000) retrouve une diminution de l'œdème cellulaire 24 heures après une ischémie cérébrale (Figure 5).

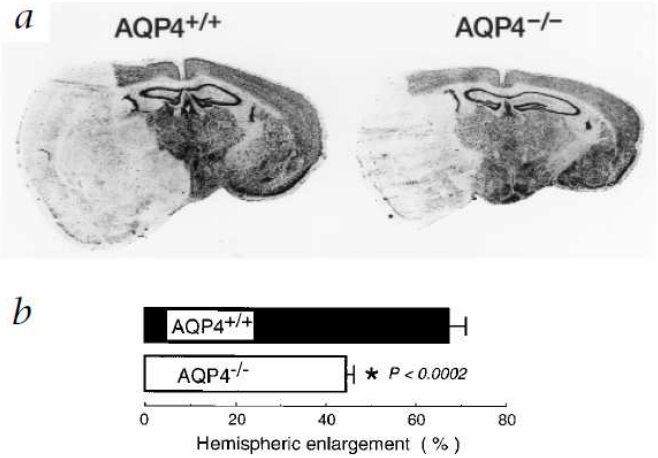


Figure 5: étude histologique de cerveaux de souris exprimant l'AQP4 et KO pour AQP4 après une occlusion de l'artère cérébrale moyenne. Mise en évidence d'un œdème hémisphérique majeure chez les souris exprimant l'AQP4 (d'après Manley et al, Nat Med, 2000)

Une surexpression des AQP4 est également retrouvée en conditions pathologiques chez l'homme à la suite de TC (Hu, Yao et al. 2005). Dans un modèle *in vitro* d'intoxication au manganèse, l'œdème astrocytaire semble directement lié à l'augmentation de l'expression des AQP 4 via la phosphorylation la voie Erk (Rao, Jayakumar et al. 2010). La surexpression des AQP4 semble donc néfaste en favorisant l'entrée d'eau intracellulaire et donc l'œdème cytotoxique. Cette hypothèse est récemment remise en question par Hirt et al (Hirt, Ternon et al. 2009) : une surexpression des AQP4, coïncidant avec la formation de l'OC au sein du territoire ischémié, est confirmée par cette équipe mais l'induction de l'expression des AQP4 semble également diminuer la formation de l'OC chez la souris. Il se pourrait donc que la surexpression initiale des AQP4 soit néfaste en termes d'œdème cellulaire mais que par la suite leur surexpression soit bénéfique afin d'éliminer ce même œdème. L'utilisation d'inhibiteurs des AQP pourraît ainsi permettre d'étudier plus précisément leur effet sur l'OC après une agression cérébrale. Le Phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) fait parti de ces inhibiteurs non spécifiques des AQP. Le PMA en activant la protéine kinase C intervient à plusieurs niveaux de régulation de l'AQP4. Le PMA provoque ainsi une diminution de l'expression de l'AQP4 par diminution de la synthèse d'ARNm d'AQP4. Dans un modèle d'ischémie cérébrale par occlusion de l'artère cérébrale moyenne chez le rat,

l'utilisation du PMA a entraîné une diminution de l'œdème cérébral ischémique (Fazzina, Amorini et al. 2010). Dans le modèle de TC par impact-accélération, une étude récente a montré que l'inhibition post-traumatique de l'AQP-4 et -9 par des anticorps spécifiques diminuait le contenu en eau intra-cérébral des rats traumatisés ainsi que les dommages neuronaux à la 24ème heure post TC. Une amélioration neurocomportementale a été également retrouvée (Shenaq, Kassem et al. 2012). Le rôle exact des aquaporines dans la génèse ou la clairance de l'œdème cérébral reste cependant largement débattu. La compréhension du mécanisme d'action de ces canaux constitue cependant une voie de recherche importante pour le traitement de l'œdème cérébral post-traumatique.

3. Conséquences cellulaires de l'œdème cérébral post-traumatique

3.1 Conséquences sur le couple neurone-astrocyte

Neurones et astrocytes sont intimement liés par des mécanismes physiologiques complexes. Ainsi les astrocytes, cellules gliales majoritaires du système nerveux central occupant la moitié du volume parenchymateux cérébral, ont un rôle clef dans le maintien de l'homéostasie neuronale. Ils ont en effet un rôle important dans le relargage et la recapture du glutamate, dans l'approvisionnement énergétique neuronal (notamment en lactate), ainsi que dans l'homéostasie du K+ et des ions H+, dans la réabsorption d'H_2O et dans la neutralisation des radicaux libres par l'intermédiaire du glutathion qu'il fournit aux neurones (Chen et Swanson, 2003). Le gonflement astrocytaire précoce compromet ainsi le fonctionnement du couplage métabolique neurone-astrocyte, notamment de la navette lactate astrocyte-neurone (Figure 6) (Belanger, Allaman et al. 2011).

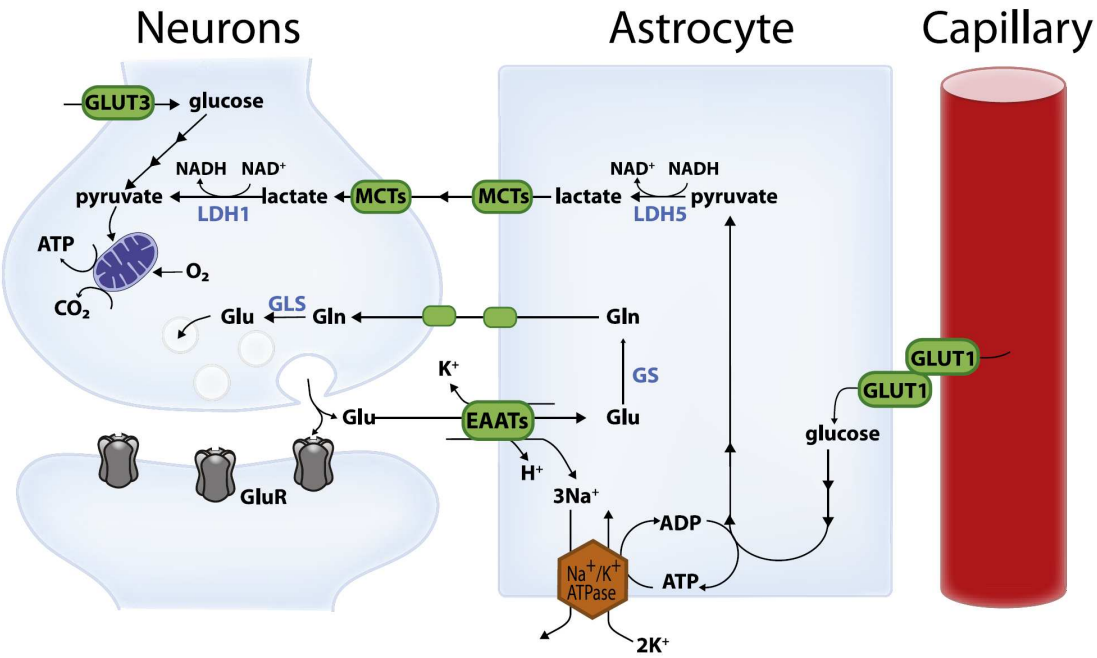


Figure 6 : Représentation schématique de la navette lactate astrocyte-neurone d'après Bélanger et al., 2011.

3.2 Conséquences mitochondriales

L'oedéme cérébral s'accompagne d'une augmentation du calcium intra cytoplasmique, responsable à son tour d'une entrée massive de calcium au sein de la matrice mitochondriale par le biais de pompes Na/Ca ATP dépendantes. Cette séquestration de calcium aboutit à un œdème mitochondrial (Castejon et de Castejon, 2004) et à un dépassement des capacités bioénergétiques mitochondriales. Ainsi, la membrane mitochondriale externe devient perméable aux molécules de moins de 1500 Da par ouverture du pore mitochondrial de transition de perméabilité (mPTP) entrainant une dépolarisation mitochondriale et un arrêt de la production d'ATP. C'est le phénomène de transition de perméabilité (Galluzzi, Blomgren et al. 2009). Ces lésions mitochondriales entrainent donc l'utilisation des voies métaboliques anaérobies pour produire de l'ATP avec élévation des taux locaux de lactate. L'association à une réduction incomplète des molécules d'oxygène en lien avec les lésions mitochondriales entraine la production de radicaux libres. Ces derniers vont altérer la membrane interne de la mitochondrie en oxydant les

phospholipides et les protéines membranaires, réduisant ainsi la fluidité de la membrane. La modification de la structure tridimensionnelle des protéines va aboutir à leur agrégation, fragmentation, altérant ainsi leur fonction (Lifshitz, Sullivan et al. 2004). L'augmentation des radicaux libres semble également liée au dépassement des capacités des systèmes anti oxydants mitochondriaux. De nombreuses protéines de l'espace intermembranaire (cytochrome c, AIF, Smac/DIABLO, endonuclease G, Omi/HtrA2) sont relâchées suite à la rupture la membrane mitochondriale externe. Elles déclenchent alors l'apoptose par activation de la voie des caspases qui est responsable *in fine* de la fragmentation de l'ADN nucléaire.

3.3 La mort cellulaire

L'ensemble des phénomènes décrits ci-dessus aboutit à des altérations structurales et fonctionnelles cellulaires, susceptibles d'entraîner la mort cellulaire. Celle-ci est classiquement définie par trois types (figure 7) : la nécrose, l'apoptose et l'autophagie (Pedersen, Larsen et al. 2009). Les deux derniers types, énergie dépendants, constitue la mort cellulaire programmée, survenant à la phase précoce et tardive post-traumatique.

La nécrose se caractérise, au sein du tissu cérébral lésé, par un gonflement cellulaire, la fragmentation de l'ADN, une atteinte des organites cytoplasmiques, une lyse membranaire et une stimulation des mécanismes de l'inflammation. L'activation des cellules phagocytaires nettoie le parenchyme cérébral de ces cellules nécrotiques (Werner et Engelhard 2007).

L'apoptose se caractérise par l'activation d'enzymes cataboliques (les protéases notamment), la néosynthèse de protéines apoptotiques (les caspases) et la décomposition programmée des structures cellulaires et des organites (Pedersen, Larsen et al. 2009). Deux voies principales de l'apoptose sont classiquement décrites : une voie caspase-dépendante et une voie caspase-indépendante (Zhang, Chen et al. 2005). Dans l'apoptose caspase-dépendante, deux voies sont également décrites. La voie extrinsèque est

activée par la mort extracellulaire induisant une interaction ligand-récepteur (comme par exemple le TNFα et son récepteur). La voie intrinsèque, quant à elle, est initiée par le stress des organites intracellulaires ou par des lésions des brins d'ADN. Ces deux voies convergent vers l'activation des caspases-3, -6 et -7, provoquant la fragmentation de l'ADN. L'apoptose caspase-indépendante est liée à la libération d'une proteine mitochondriale, l' AIF (*Apoptosis- inducing factor*) responsable de la fragmentation de l'ADN après translocation nucléaire (Bredesen, Rao et al. 2006).

L'autophagie est un processus cellulaire récent au cours duquel les protéines et organites intracellulaires sont dégradés suite à un stress cellulaire. Il existe trois sortes d'autophagie : la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie liée aux protéines chaperons. Ces différents types partagent la même cible intracellulaire : le lysosome mais diffèrent par leur processus d'activation, leur régulation, les composants cellulaires formés ainsi que les voies de livraison au lisosome (Pedersen, Larsen et al. 2009).

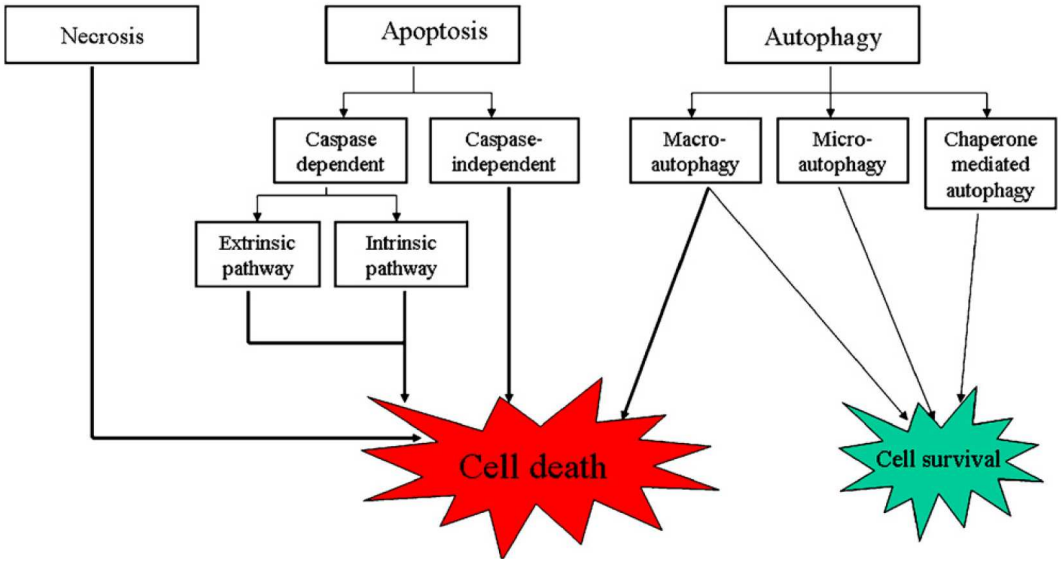


Figure 7 : les différentes voies de la mort cellulaire (d'après Pedersen et al., 2009)

4. Evaluation de l'œdème cérébral post-traumatique

4.1 Méthodes de mesure de l'œdème cérébral

4.1.1 Méthodes de mesure IRM

IRM de diffusion

La diffusion représente le mouvement aléatoire des molécules sous l'influence de l'agitation thermique, appelé mouvement Brownien. Elle dépend de la masse de la molécule (type de molécule), de la température et de la viscosité du milieu selon l'équation d'Einstein. Dans un milieu hétérogène comme les tissus vivants, la valeur de la diffusion mesurée dépend étroitement de la microarchitecture locale (compartimentation, tortuosité, anisotropie du milieu). En IRM de diffusion, les images sont contrastées par la mesure de la diffusion des molécules d'eau qui donne une valeur apparente du coefficient de diffusion (*apparent diffusion coefficient, ADC*) différente d'un tissu à l'autre. Par exemple, les molécules d'eau contenues dans le LCR ont une diffusion moins limitées que les molécules présentes dans l'espace intra ou extra-cellulaire : cette différence de diffusion est utilisée en IRM pour produire un contraste visible dans les séquences dites pondérées en diffusion où le signal RMN est d'autant plus atténué que la diffusivité des molécules d'eau est plus importante. Le principe de mesure de la diffusion moléculaire de l'eau repose sur l'application de gradients de champ magnétique. En effet, le signal RMN devient sensible à la diffusion moléculaire en présence d'inhomogénéités de champ statique B_0. Ces gradients peuvent être appliqués selon 3 axes orthogonaux (Ox, Oy et Oz). L'acquisition du signal RMN pour chaque application selon Ox, Oy ou Oz donne une image pondérée en diffusion qui reflète la diffusion de l'eau dans la direction spatiale du gradient de champ magnétique. A partir de ces acquisitions, on obtient donc 3 images dont on peut extraire voxel par voxel une valeur apparente du coefficient de diffusion selon 3 axes. La valeur moyenne obtenue à partir de ces 3 acquisitions représente

ensuite la diffusivité moyenne de l'eau pour chaque voxel, indépendante de l'axe d'orientation des gradients de diffusion (Huisman, 2003).

L'oedème cellulaire est défini par une augmentation de l'eau intra-cellulaire. L'apparition d'un oedème cellulaire provoque un abaissement de l'ADC en IRM de diffusion (Ito, Marmarou et al. 1996). A l'opposé, l'apparition d'un oedème vasogénique est responsable d'une augmentation de l'ADC. L'étude du coefficient apparent de diffusion de l'eau est donc adaptée à l'évaluation de l'oedème cérébral post-traumatique puisqu'il permet de distinguer oedème cellulaire et oedème vasogénique.

T_1 quantitatif

L'étude de l'oedème cérébral par l'étude du temps de relaxation longitudinal T_1 est connue depuis 30 ans (Naruse, Horikawa et al. 1982). Ainsi de nombreuses études expérimentales ont pu établir une relation entre le contenu en eau intra-cérébral (CEI) et le temps de relaxation T_1. L'équipe de Marmarou a pu ainsi mettre en évidence une corrélation entre les valeurs quantitatives de T_1 mesurées en RMN (T_1 quantitatif) et les variations du contenu en eau intracérébral mesurées par méthode gravimétrique et/ou par méthode poids frais/poids sec (Barzo, Marmarou et al. 1996; Schwarcz, Berente et al. 2002). Il a pu être également démontré que cette relation existait quelque soit la fraction libre et liée d'eau et quelque soit l'intensité du champ magnétique statique B_0 (Fatouros, Marmarou et al. 1991) (figure 8). Cette relation est également retrouvée dans un modèle expérimental d'ischémie cérébrale focalisée (Barbier, Liu et al. 2005).

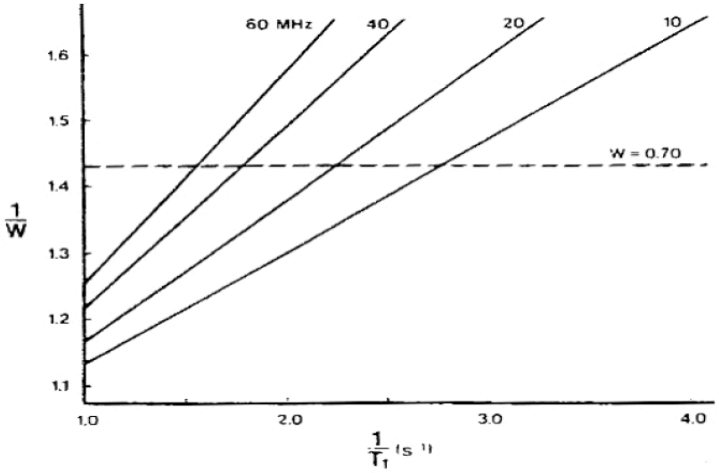


Figure 8 : relation linéaire entre l'inverse du T_1 et l'inverse du contenu en eau intra-cérébral (CEI) (Fatouros, Marmarou et al. 1991)

Les données expérimentales ont été par la suite confirmées par des données cliniques comparant l'oedème cérébral présent après neurochirurgie tumorale avec des volontaires sains (Fatouros et Marmarou, 1999). Par la suite en 2000, Marmarou dans une étude sur 76 patients avec TC sévère a pu utiliser la méthode du T_1 quantitatif pour démontrer l'origine oedémateuse du gonflement cérébral post-traumatique en comparaison avec l'étude simultanée du volume sanguin cérébral (Marmarou, Fatouros et al. 2000). Cependant, cette méthode RMN nécessite de travailler à haut champ magnétique et semble ainsi peu adapter pour un usage clinique. Celle-ci ne permet pas non plus de distinguer œdème cellulaire et œdème vasogénique.

4.1.2 Méthodes ex vivo de mesure du contenu en eau intra-cérébral

Ces méthodes de mesure nécessitent le prélèvement de tissu cérébral pour mesurer le contenu en eau de biopsies cérébrales réalisées en per-opératoire chez l'homme ou après sacrifice de l'animal en expérimental.

<u>Gravimétrie spécifique</u>

Cette méthode, plus largement détaillée dans la deuxième partie (méthodologie générale), consiste à effectuer des prélèvements de cerveau afin de les immerger dans une colonne liquidienne étalonnée, constituée d'un

mélange kerosène-bromobenzène. La position en hauteur du prélèvement au sein de la colonne permet ainsi d'obtenir la spécificité gravimétrique (SpGv) du prélèvement. Le contenu en eau en pourcentage (% H_2O) est ensuite obtenu par les formules suivantes (Fatouros, Marmarou et al. 1991):

% H20 = 462,6 / SpGv – 362,6 pour la substance grise

% H20 = 826,2 / SpGv – 726,2 pour la substance blanche

Méthode poids frais/poids sec

Le principe de cette méthode repose sur la mesure du poids d'un prélèvement cérébral à l'état frais puis séché à 90°C jusqu'à un poids constant. Le contenu en eau (CEI) du prélèvement est obtenu par la formule :

CEI = 100 x (poids frais-poids sec)/poids frais

4.3. Caractérisation de l'œdème cérébral diffus post-traumatique

La caractérisation de l'OC diffus post-traumatique est un sujet à controverse puisqu'à travers les différentes études expérimentales différents concepts sont proposés. Un premier concept, présenté par l'équipe de Marmarou, est celui d'une évolution biphasique de l'ADC avec une ascencion précoce de l'ADC suivie de sa diminution progressive (Barzo, Marmarou et al. 1997). L'élévation initiale de l'ADC est expliquée par un dysfonctionnement précoce et réversible de la BHE décrite en IRM (Barzo, Marmarou et al. 1996) d'environ 30 minutes (figure 9).

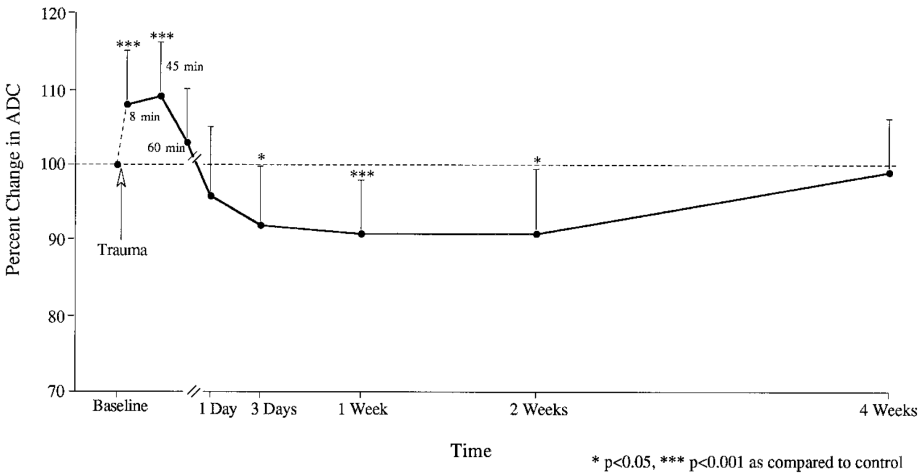


Figure 9 : Evolution biphasique de l'ADC d'après Barzo et al., 1996

Cette ouverture de la BHE n'est cependant pas unanimement reconnue et certaines équipes ne la retrouvent qu'entre la 1ère et la 24ème heure (Hellal, Bonnefont-Rousselot et al. 2004). Par ailleurs, l'équipe de Beaumont n'a retrouvé aucun franchissement de la BHE par un traceur intravasculaire dans les suites d'un TC diffus expérimental, traduisant ainsi le maintien de l'intégrité de la BHE après TC diffus (Beaumont, Fatouros et al. 2006). Ceci a été confirmé par notre équipe en marge d'un traval sur l'érythropoïétine (cf. ci-après) (Valable et al, 2010). Pour la plupart des études expérimentales travaillant sur un modèle de TC diffus, l'abaissement de l'ADC est retrouvé (Ito, Marmarou et al. 1996; Albensi, Knoblach et al. 2000) avec une réascencion pour certains au 18ème jour (Liu, Maldjian et al. 1999).

Concernant les études cliniques, l'équipe de Marmarou retrouve une prédominance de l'oedème cellulaire (baisse de l'ADC) dans les suites d'un TC focal (Marmarou, Portella et al. 2000) ou d'un TC diffus (Marmarou, Signoretti et al. 2006). Cependant des résultats contradictoires sont retrouvés dans différentes équipes (Rugg-Gunn, Symms et al. 2001; Goetz, Blamire et al. 2004; Shanmuganathan, Gullapalli et al. 2004) qui retrouvent une augmentation des ADC. Cette augmentation de l'ADC est expliquée par les destructions neuronales augmentant la diffusivité de l'eau interstitielle ; en revanche ces études IRM ont été effectuées de manière tardive ce qui les différencient des autres études cliniques présentées ci-dessus. Enfin, Hergan et al. identifient 2 types de lésions axonales diffuses (LAD) : l'une avec rupture de BHE et élévation de l'ADC et l'autre avec oedème cellulaire et baisse de l'ADC (Hergan, Schaefer et al. 2002), ce qui pourrait expliquer la disparité des résultats cliniques en imagerie de diffusion. Dans une revue de la littérature de 116 cas de patients présentant un TC diffus, 64% des patients avaient une baisse de leur ADC et 34% une augmentation de l'ADC (Schaefer, Huisman et al. 2004).

En conclusion, les lésions axonales diffuses entraînent une diminution de l'ADC dans les modèles de traumatisme diffus au sein de la substance grise étudiée de manière précoce.

L'augmentation de l'ADC retrouvée dans d'autres études peut être attribuée :

- à l'apparition d'un oedème vasogénique.
- à l'étude de l'ADC dans la substance blanche, où la diffusion est augmentée par rupture des axones.
- à des études tardives avec une diffusion augmentée dans les espaces interstitiels par destructions cellulaires.

4.3. Le modèle expérimental de TC par impact-accélération

4.3.1 Description initiale du modèle

Le modèle de TC par impact-accélération a été initialement décrit par Marmarou (Marmarou, Foda et al. 1994). Celui-ci consiste à lâcher un poids de 450g d'une hauteur de 1m50 sur la tête de l'animal protégée par une pastille en laiton (Figure 10, cf partie II, méthodologie générale). Ce mécanisme lésionnel provoque alors des lésions cérébrales diffuses avec un œdème cérébral diffus sans hémorragie ni fracture. Ce modèle est plus proche de la réalité clinique que les modèles *in vivo* avec ouverture de la dure-mère (impact cortical contrôlé, percussion directe du cortex par un fluide sous pression) ou que les modèles *in vitro*.

L'œdème cérébral décrit en microscopie électronique était caractérisé par un œdème astrocytaire péricapillaire prédominant au niveau du cortex visualisé dès la 6ème heure post-traumatique, avec un maximun à la 24ème heure. 10 jours après le TC, l'œdème cérébral n'était plus visualisé en microscopie électronique (Foda et Marmarou, 1994). Il est intéressant de noter que les jonctions serrées paraissaient indemnes.

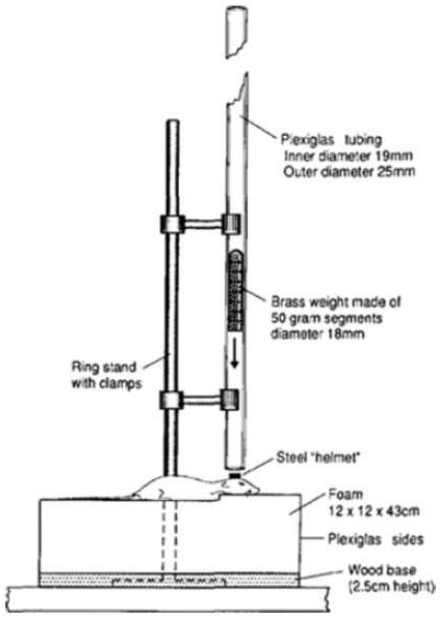


Figure 10 : modèle de TC par impact-accélération d'après Maramarou et coll, 1994

4.3.2 Le modèle développé au laboratoire

Depuis le début des années 2000, le modèle d'impact-accélération a été développé au sein du laboratoire des neurosciences de Grenoble. Après une phase de mise en place du modèle, la première étude publiée utilisant ce modèle décrivait un œdème cérébral au sein du cortex et du striatum des rats traumatisés (Verdonck, Lahrech et al. 2007). La présence d'un œdème cérébral post-traumatique était étudiée par IRM de diffusion et T_1 quantitatif toutes les heures de la première à la sixième heure post-traumatique montrant une baisse de l'ADC et un allongement du T_1. La réalisation de gravimétrie spécifique six heures après le TC retrouvait également une augmentation du contenu en eau intracérébral de 1 à 2%. Dans une deuxième étude, l'absence de lésion post-traumatique de la BHE a été constatée par mesure du T_1 quantitatif après injection de manganèse et de gadolinium (Valable, Francony et al. 2010). Un œdème cérébral cellulaire était également retrouvé dès la première heure post-traumatique en IRM de diffusion.

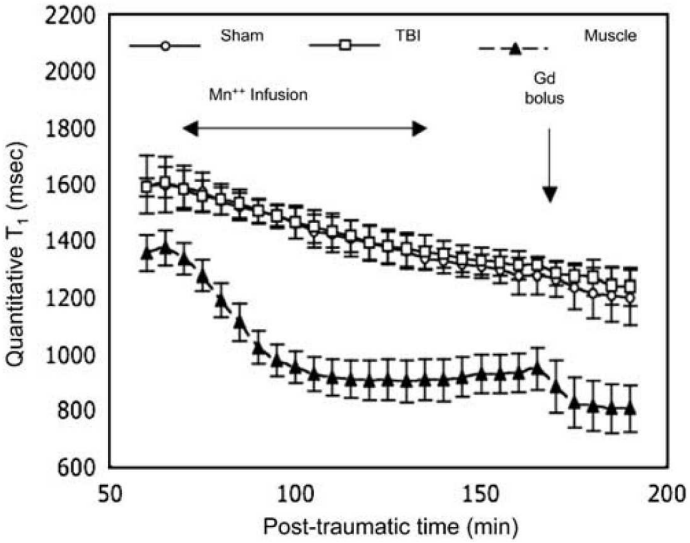


Figure 11 : Evolution temporelle du T_1 quantitatif dans le tissu cérébral chez des rats sains (Sham), traumatisés (TBI) et dans le muscle temporal après infusion pendant 1 heure de manganèse et bolus de gadolinium. L'absence de chute brutale du T_1 dans le cerveau (visualisée par contre dans le muscle temporal) traduit l'absence d'augmentation de la perméabilité de la BHE pour le manganèse et le gadolinium. D'après Valable et al, 2010.

5. Conclusion

L'œdème cérébral post-traumatique constitue la pierre angulaire de la constitution des lésions cérébrales secondaires par ses conséquences sur l'hémodynamique cérébrale (HTIC) et par ses conséquences cellulaires. Le modèle expérimental de TC par impact-accélération est un excellent modèle d'œdème cérébral cellulaire diffus, caractérisable *in vivo* par IRM de diffusion et *ex vivo* par gravimétrie spécifique. Une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'œdème cérébral post-traumatique comme l'évaluation de thérapeutiques anti-oedémateuses sont donc réalisables avec ce modèle expérimental.

CHAPITRE II

L'hypoxie cérébrale post-traumatique

1. Introduction

En l'absence d'agents neuroprotecteurs ayant donné des résultats tangibles sur le plan clinique (Narayan, Michel et al. 2002), l'essentiel de la réanimation du patient ayant un TC grave est de prévenir et corriger toutes les situations à risque d'hypoxie cérébrale, avant l'instauration de lésions ischémiques irréversibles. Les méthodes de détection de l'hypoxie cérébrale au lit du patient sont schématiquement de 4 ordres : 1) la PIC permet le calcul de la pression de perfusion cérébrale (PPC), avec PPC = pression artérielle moyenne (PAM) – PIC; 2) le débit sanguin cérébral (DSC), estimé par les vélocités sanguines des artères cérébrales mesurées au Doppler transcrânien (DTC); 3) l'électroencéphalographie (EEG); 4) le métabolisme cérébral estimé par la saturation veineuse jugulaire en oxygène ($SvjO_2$), la spectroscopie en proche infrarouge (NIRS), la microdialyse cérébrale et la pression tissulaire en oxygène ($PtiO_2$). En routine clinique, la mesure de la PIC reste l'outil indispensable pour la surveillance continue des patients ayant un TC grave. L'HTIC post-traumatique, définie par une PIC supérieure à 20 mmHg, est un facteur de surmortalité (Bratton, Chestnut et al. 2007). Dès lors, pour prévenir l'ischémie cérébrale secondaire à l'HTIC, les recommandations internationales proposent des valeurs de PPC entre 60 et 70 mmHg, avec un contrôle de la PIC inférieure à 20 mmHg (Bratton, Chestnut et al. 2007). Cependant, maintenir une PPC et une PIC optimales ne met pas forcément le patient à l'abri d'une baisse de la perfusion voire d'une hypoxie cérébrale. Ainsi, l'effet vasoconstricteur (réduction du volume sanguin cérébral) de l'hypocapnie a permis de diminuer la PIC au prix d'une majoration des zones d'ischémie cérébrale (Coles, Minhas et al. 2002). Des études cliniques ont rapporté l'existence d'épisodes d'hypoxie cérébrale ($PtiO_2$ <15 mmHg) malgré la normalisation des chiffres de PIC et de PPC, avec un retentissement direct sur le devenir neurologique des patients traumatisés (Oddo, Levine et al. 2011).

Ainsi l'étude de l'oxygénation cérébrale post-traumatique apparaît nécessaire pour limiter les épisodes d'hypoxie cérébrale post-traumatique et améliorer le pronostic neurologique des patients avec un TC grave.

2. Les paramètres de l'oxygénation cérébrale

L'étude de l'oxygénation cérébrale post-traumatique nécessite au préalable de définir les différents paramètres mesurables de l'oxygénation cérébrale.

2.1. Notion de PO_2

La pression partielle en oxygène (PO_2) est l'élément moteur du transport de l'oxygène dans l'organisme, puisque tout gaz diffuse des zones de haute vers les zones de basse pression, quelque soit le milieu dans lequel il se trouve.

La loi de Dalton énonce que, dans un mélange gazeux, la pression totale est égale à la somme des pressions partielles des gaz constituant le mélange. Au sein d'un mélange gazeux, la pression partielle d'un gaz s'obtient donc en multipliant sa concentration fractionnelle (sa «proportion») par la pression totale exercée par le mélange. Dans l'atmosphère terrestre, l'oxygène a une proportion de 20,95% de l'atmosphère totale. La pression atmosphérique au niveau de la mer étant de 760 mmHg, la PO_2 est donc égale à 159 mmHg. La proportion de l'oxygène ne varie pas en fonction de l'altitude, c'est la baisse de la pression atmosphérique qui explique la diminution de la PO_2 liée à l'altitude.

2.2. Cascade de l'oxygène

Depuis l'air alvéolaire jusqu'à la mitochondrie, un énorme gradient de pression partielle est créé. Le phénomène de diffusion est un phénomène passif qui suit ce gradient de pression partielle. Cette baisse progressive de la PO_2 du milieu extérieur vers les mitochondries s'appelle la cascade de l'oxygène (figure 12). On note que la PO_2 tissulaire ($PtiO_2$), de l'ordre de 40 mmHg est très inférieure à la PO_2 atmosphérique.

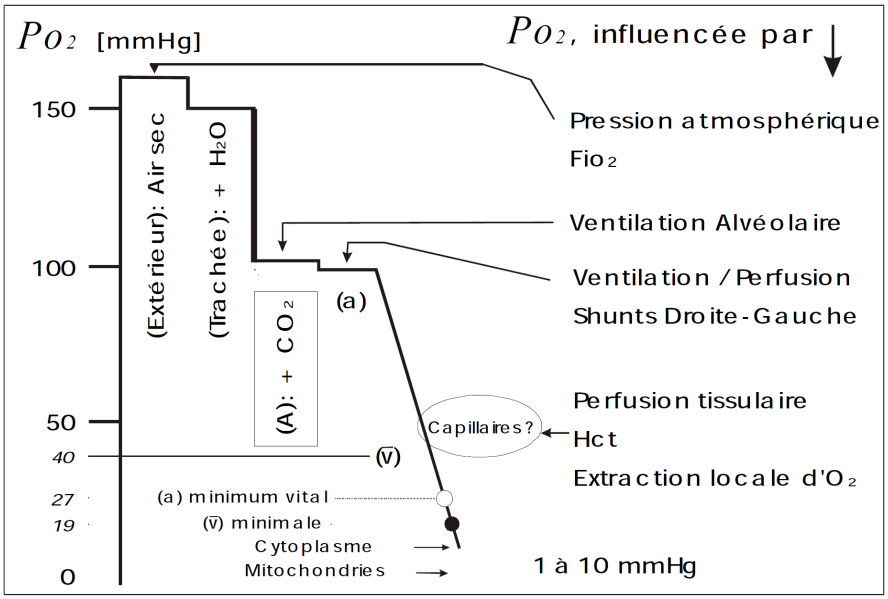


Figure 12 : cascade de l'oxygène d'après w*ww.md.ucl.ac.be/virtanes/ oxy.PDF*

2.3. Notion de SO_2, OEF et $CMRO_2$

La saturation en oxygène de l'hémoglobine (SO_2) est définie par la proportion de molécules d'hémoglobine (Hb) qui sont oxygénées, parmi la totalité des molécules d'hémoglobine, oxygénées HbO_2 (oxyhémoglobine) et non oxygénées d'Hb (déoxyhémoglobine) :

$$SO_2 = \frac{HbO_2}{HbO_2 + dHb}$$

Le taux de saturation de l'hémoglobine en oxygène est déterminé par la pression partielle en oxygène dans le sang, selon la courbe de dissociation de l'hémoglobine ou courbe de Barcroft (Figure 13). Cette courbe de dissociation dépend également de la température et du pH.

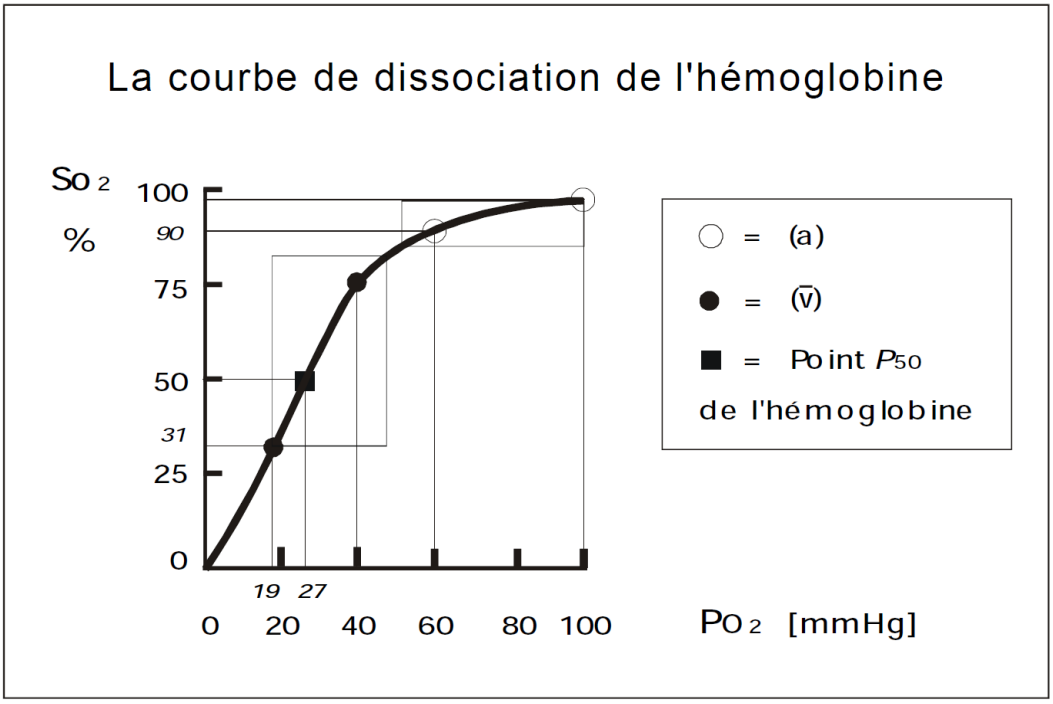


Figure 13 : Courbe de dissociation de l'hémoglobine d'après *www.md.ucl.ac.be/virtanes/oxy.PDF*

La consommation d'oxygène par le tissu cérébral ($CMRO_2$, *Cerebral Metabolic Rate of Oxygen*) est définie comme la quantité d'oxygène consommée par unité de temps et pour une masse de tissu donnée. Le principe de Fick relie la $CMRO_2$ par le tissu, le débit sanguin cérébral (DSC ou *Cerebral Blood Flow, CBF*) et les saturations en oxygène du sang artériel (SaO_2) et veineux (SvO_2) :

$$CMRO_2 = CBF \times 1{,}34 \times Hb \times (SaO_2 - SvO_2)$$

On peut également définir la fraction d'extraction en oxygène (OEF, *Oxygen Extraction Fraction*) qui représente la différence relative de saturation en oxygène entre les territoires artériels et veineux :

$$OEF = \frac{SaO_2 - SvO_2}{SaO_2}$$

2.4. Valeurs normales

Les valeurs normales de $PtiO_2$ ont été acquises soit en expérimental chez l'animal, soit chez l'homme à partir de mesures réalisées pendant une procédure neurochirurgicale dans une zone de cerveau traumatisé a priori macroscopiquement saine. Dans un modèle félin, la valeur normale retenue fut 42 mmHg (Zauner, Bullock et al. 1995) et dans un modèle murin 29,4 mmHg (Critchley et Bell, 2003). Chez l'homme les valeurs vont de 37 mmHg à 48 mmHg chez des patients opérés pour l'exclusion d'un anévrisme cérébral non rompu (Nortje et Gupta, 2006). Chez un sujet éveillé indemne de lésions cérébrales, la valeur de $PtiO_2$ au niveau de la substance blanche est de 23±7 mmHg (Pennings, Schuurman et al. 2008).

La $SvjO_2$ normale est autour de 60-70% chez l'homme, permettant de définir une OEF à 30-40%. La $CMRO_2$ normale globale du cerveau sain est de l'ordre de 4ml d'O2/100g/min ; cette $CMRO_2$ est bien sur extrêmement variable selon l'activité cérébrale, la profondeur de l'anesthésie générale ou la température cérébrale par exemple.

3. L'ischémie et l'hypoxie cérébrale post-traumatique

L'ischémie cérébrale, c'est-à-dire la diminution du débit sanguin cérébral, est indissociable de l'hypoxie cérébrale puisque toute diminution de l'apport en oxygène influence l'oxygénation cérébrale. Ainsi l'ischémie cérébrale occupe un rôle central dans le pronostic neurologique des patients ayant un TC grave. Cette ischémie survient dans les premières heures post-traumatiques, et son intensité est directement en lien avec le pronostic neurologique des patients (Bouma, Muizelaar et al. 1992). Les seuils admis pour définir une zone d'ischémie et de pénombre après un accident vasculaire cérébral sont plus élevés en traumatologie crânienne, témoignant d'une sensibilité particulière du cerveau à l'ischémie post-traumatique (Cunningham, Salvador et al. 2005). L'hypoxie cérébrale, quant à elle, correspond à une inadéquation entre les apports et les besoins en oxygène. De fait, l'hypoxie cérébrale est possible

sans diminution du débit sanguin cérébral, lors par exemple d'une augmentation des besoins en oxygène inappropriée au débit sanguin cérébral.

3.1. Quelles sont les valeurs de l'hypoxie et de l'ischémie cérébrale ?

En clinique, le meilleur paramètre évaluant l'hypoxie cérébrale post-traumatique, c'est-à-dire la balance entre les apports et les besoins en oxygène, est la $PtiO_2$. Le seuil au dessous duquel la $PtiO_2$ est considérée comme pathologique reste cependant débattu. Plusieurs seuils ont été proposés dans la littérature dans la pathologie traumatique avec des critères de jugement variables, principalement basés sur le devenir neurologique des patients ou des animaux. L'ensemble des études approchant l'estimation d'un seuil de $PtiO_2$ pour détecter les épisodes d'hypoxie post-traumatique ou ischémique est résumé dans le tableau ci-dessous (Tableau 1) en fonction du capteur utilisé.

Capteur	Auteurs	Année	Seuil de $PtiO_2$	Critère de jugement
Paratrend 7	Zauner Doppenberg	1998	25 mmHg	PO_2 de 26 mmHg = DSC (xenon) < 18 ml/100 g/min ; patients PO_2 <25 mm Hg ont un mauvais devenir neurologique
Paratrend 7	Doppenberg	1998	19-23 mmHg	Occlusion ACM dans un modèle félin et devenir neurologique
Neurotrend	Menon	2004	10 mmHg	Augmentation du gradient de diffusion de l'oxygène (PvO_2-PO_2)
Neurotrend	Jonhston	2005	14 mmHg	PET OEF=40% si PO_2=14mmHg
Licox	Kiening	1996	8,5 mmHg	Seuil de $SvjO_2$ à 55%
Licox	Van Santbrink	1996	10-15 mmHg	Devenir neurologique à 6 mois
Licox	Saladka	1998	20 mmHg	Mortalité
Licox	Van Santbrink	2000	5 mmHg (pdt 30 min) 10 mmHg (pdt 1H45) 15 mmHg (pdt 4H)	Mortalité (>50% de mortalité)

Tableau 1 : Résumé des valeurs seuils de l'hypoxie tissulaire cérébrale.

Concernant l'ischémie cérébrale, le seuil ischémique retenu en clinique par la $SvjO_2$ est de 50% (Gopinath, Robertson et al. 1994). Les études classiques en TEP (Tomographie par emission de positon) chez des patients victimes d'un accident vasculaire cérébral ont déterminé des seuils pour l'ischémie irréversible à savoir un DSC à 12 ml/100ml/min et une $CMRO_2$ à 65 µmol/100ml/min (1,4 ml/100ml/min). La zone de pénombre, susceptible de récupérer aurait un seuil de DSC à 20 ml/100ml/min (Cunningham, Salvador et al. 2005). En traumatologie, les seuils semblent plus élevés avec des seuils proposés par Cunningham et al à 15 ml/100min/100g pour le DSC et 36,7 µmol/100ml/min pour la $CMRO_2$ dans un tissu cérébral contus. Le cerveau traumatisé semble ainsi plus sensible à l'ischémie, probablement en raison de phénomènes physiopathologiques associés autres que la simple atteinte macrovasculaire.

3. 2 Physiopathologie de l'hypoxie cérébrale post-traumatique

Sur le plan physiopathologique, la lésion traumatique provoque une cascade inflammatoire complexe, majorée par la faillite énergétique du métabolisme aérobie post-traumatique en raison d'une perturbation du transport artériel en oxygène, d'un déséquilibre dans l'utilisation tissulaire de l'oxygène et du glucose (crise métabolique), et/ou d'une dysfonction mitochondriale (Enriquez et Bullock, 2004). La présence de thrombose des microvaisseaux, d'œdème cellulaire, d'altération mitochondriale fait davantage évoquer une hypoxie du tissu cérébral qu'une simple ischémie. Ainsi, l'hypoxie cérébrale post-traumatique n'est pas seulement une conséquence d'altérations macrovasculaires mais reflète plutôt une interaction complexe entre le tissu lésé et son environnement microvasculaire. En résumé, dans le cerveau traumatisé, la balance entre l'apport et les besoins en oxygène peut être perturbée par l'augmentation du métabolisme cérébral, une réduction du débit sanguin cérébral et/ou un trouble de la diffusion de l'oxygène.

3.2.1 Approche macrovasculaire

La diminution du débit sanguin cérébral (DSC) est logique après un TC puisque l'élévation de la PIC entraîne une diminution de la PPC selon la formule PPC= PAM-PIC. Une diminution de la PPC peut être telle que la chute du DSC entraine la création de zones d'ischémie cérébrale (Bouma, Muizelaar et al. 1991). Ces zones d'ischémies sont fréquemment retrouvées dans les séries autopsiques et l'extension de ces zones est corrélée à l'intensité de l'HTIC (Graham, Adams et al. 1978). Ainsi le contrôle de la PIC et le maintien de la PPC sont devenus des principes fondamentaux de la neuroréanimation (Bratton, Chestnut et al. 2007; Bratton, Chestnut et al. 2007). Cependant, cette diminution du DSC n'est pas uniforme dans le cerveau (Figure 14) et dépend également du type de lésion cérébrale (Bouma, Muizelaar et al. 1992).

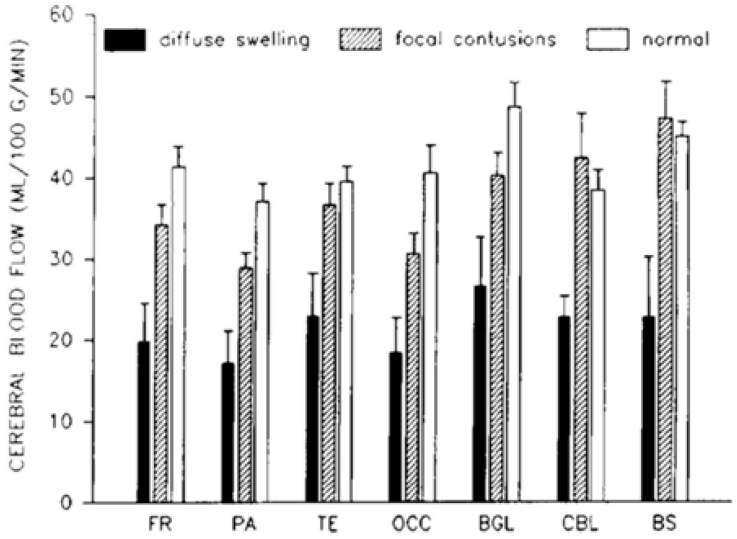


Figure 14 : DSC (*CBF*) mesuré 3 heures après le TC par ^{133}Xenon selon les région cérébrales (FR=lobe frontal, PA : lobe parietal, TE : lobe temporal, OCC : lobe occipital, BGL : ganglions de la base, CBL : cervelet, BS : tronc cérébral) et le type de lésion d'après Bouma et al., 1992.

De plus, le maintien d'une PPC adéquate ne garanti pas à lui seul une absence d'hypoperfusion régionale visualisée par TEP chez des patients traumatisés normotendus (Coles, Fryer et al. 2004). Une simple approche macrovasculaire ne suffit donc pas à expliquer les troubles de l'oxygénation cérébrale post-traumatique.

3.2.2 Approche microvasculaire

Des perturbations de la microcirculation ont été décrites en microscopie électronique à la phase précoce d'un traumatisme crânien chez l'homme, liées à un gonflement des pieds astrocytaires et une compression des capillaires (Bullock, Maxwell et al. 1991). La formation de thrombi microvasculaires dans un modèle murin de TC suggère également des perturbations microcirculatoires (Schwarzmaier, Kim et al. 2010). Enfin, chez 13 patients TC graves, une épreuve d'hyperventilation attestait par TEP l'impossibilité du tissu péri-contusionnel d'augmenter l'OEF (Figure 15) en réponse à la diminution du DSC (Menon, Coles et al. 2004). La microscopie électronique de ces mêmes zones retrouvait un gonflement des cellules endothéliales et des astrocytes responsable d'un collapsus des capillaires cérébraux. Un trouble de la diffusion de l'oxygène était donc évoqué par les auteurs par augmentation des barrières à la diffusion de l'O_2.

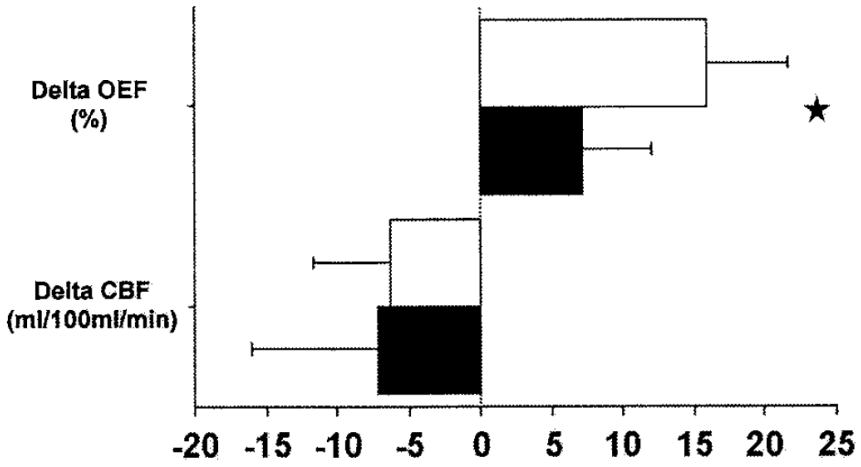


Figure 15 : Delta d'OEF et de DSC (*CBF*) chez des patients soumis à une épreuve d'hyperventilation au sein de zones hypoxiques (Barres noires) et de zones saines (barres blanches) d'après Menon et al, 2004.

L'œdème cérébral par sa localisation endothéliale périvasculaire est donc susceptible de perturber la diffusion et la disponibilité de l'oxygène pour les cellules. De plus, le fonctionnement et la régulation de la microvascularisation restent mal connus, dépassant probablement le simple concept d'autorégulation capillaire suivant la demande métabolique. Ainsi

l'hétérogénéité des temps de transit des globules rouges dans les capillaires sont susceptibles d'influencer l'extraction d'oxygène par les cellules (Jespersen et Ostergaard 2012). Les perturbations microcirculatoires post-traumatiques deviendraient ainsi un déterminant fondamental de l'oxygénation cérébrale.

3.2.3. Approche métabolique

Il est communément admis que le métabolisme cérébral est réduit immédiatement après un traumatisme crânien en rapport avec l'effet du traumatisme lui-même combiné avec l'utilisation d'agents anesthésiques pour maintenir le patient sous sédation. L'étude de la $CMRO_2$ chez 49 patients traumatisés crâniens retrouvait ainsi une diminution d'environ 50% des chiffres de $CMRO_2$ par comparaison avec des sujets contrôles pendant la première semaine post-traumatique (Glenn, Kelly et al. 2003), suggérant un maintien de l'OEF malgré l'altération du débit sanguin cérébral. Cette altération du métabolisme cérébral oxydatif survient précocement pendant les 15 jours post-traumatiques et a un impact sur le pronostic neurologique des patients (Jaggi, Obrist et al. 1990). Cependant, l'excitotoxicité post-traumatique pourrait également être responsable d'une augmentation du métabolisme cérébral entrainant une inadéquation entre les besoins métaboliques et le débit sanguin cérébral responsable d'une élévation de l'OEF. L'étude de l'OEF par TEP (Cunningham, Salvador et al. 2005) chez 14 patients traumatisés retrouvait une diminution de l'OEF (72 heures après le TC) dans les zones contuses en comparaison avec les zones non lésées malgré une diminution du débit sanguin cérébral dans ces mêmes zones (figure 16). La diminution de l'OEF dans les régions contuses refléterait alors la mort cellulaire et l'inaptitude du tissu lésé à extraire l'oxygène. La dysfonction mitochondriale post-traumatique est également un facteur influençant l'OEF : chez 16 patients victimes d'un TC grave, l'analyse par oxygraphie de mitochondries extraites lors d'une chirurgie d'évacuation d'hématome intracérébral retrouvait une altération de la production d'ATP (Phase 3), expliquant les diminutions de l'OEF à débit sanguin cérébral préservé par inefficacité de l'utilisation de l'oxygène par les cellules cérébrales (Verweij, Muizelaar et al. 2000). Cette altération du métabolisme mitochondrial est soutenue également par des études

expérimentales en neurotraumatologie retrouvant également une diminution de la production d'ATP notamment dans un modèle de TC focal dès la 3ème heure post-traumatique (Lifshitz, Sullivan et al. 2004; Singh, Sullivan et al. 2006). Cependant les contusions cérébrales représentent une catégorie de lésion particulière et l'ensemble des lésions post-traumatiques ne s'accompagne pas d'une diminution de l'OEF (Menon, Coles et al. 2004).

	CBF (ml/100 ml/min)	$CMRO_2$ (µmol/100 ml/min)	OEF (%)
Non-lesion ROIs	33.0 (9.4)	76.4 (33.1)	36.4 (16.7)
Lesion ROIs	16.9 (12.5)	36.7 (32.1)	25.3 (13.2)
*P**	<0.005	<0.005	<0.005

*Mann–Whitney *U*-test.

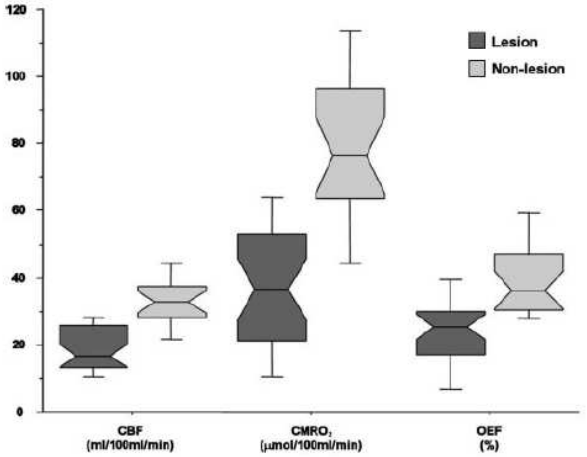


Figure 16 : Débit sanguin cérébral (*CBF*), $CMRO_2$ et OEF chez 14 patients avec des contusions cérébrales (*Lesion*) d'après Cunningham et al. , 2005.

3.3. Quelle est la valeur pronostique du monitorage de l'oxygénation cérébrale en clinique ?

En neurotraumatologie, le seuil à partir duquel le pronostic neurologique est altéré correspond à une $PtiO_2$ inférieure à 15 mmHg (van den Brink, van Santbrink et al. 2000). Plus précisément, une hypoxie cérébrale avec $PtiO_2$ inférieure à 10 mmHg pendant plus de 15 minutes a été associée, après ajustement, à une surmortalité (odds ratio 4,6) et à davantage de séquelles neurologiques lourdes (odds ratio 4,0) (Maloney-Wilensky, Gracias et al. 2009) . Des études cliniques ont montré l'intérêt d'une stratégie thérapeutique guidée

par la mesure de la $PtiO_2$ pour compléter l'information donnée par la mesure de PIC/PPC et optimiser l'oxygénation cérébrale chez des patients TC graves. Ainsi, l'obtention d'une $PtiO_2$ supérieure à 10 mmHg a été utilisée pour titrer la PPC et réduire la durée des épisodes d'ischémie (Meixensberger, Jaeger et al. 2003). Dans une étude de type avant-après, la mortalité hospitalière et le statut neurologique à la sortie de l'hôpital ont été meilleurs pour 28 patients traités de façon à maintenir une $PtiO_2$ supérieure à 25 mmHg par rapport à 25 patients traités de manière conventionnelle (PIC/PPC) (Stiefel, Spiotta et al. 2005). D'autres séries de patients traumatisés graves ont confirmé ces résultats, avec une mortalité moindre et de meilleurs scores neurologiques à 6 mois par rapport à une cohorte historique traitée de manière conventionnelle (Narotam, Morrison et al. 2009; Spiotta, Stiefel et al. 2010). Cependant, ces effets bénéfiques liés l'emploi de la $PtiO_2$ sur le devenir neurologique des patients ayant un TC grave n'ont pas été confirmés dans 2 autres études cliniques (Adamides, Cooper et al. 2009; Martini, Deem et al. 2009).

4. Méthodes de mesure de l'oxygénation cérébrale

L'absence de méthode de référence pour la mesure de l'oxygénation cérébrale ainsi que la multiplicité des paramètres susceptibles d'être mesurés imposent une revue des différentes méthodes disponibles à la fois en clinique et en expérimental pour étudier les différents paramètres de l'oxygénation cérébrale. La mesure de la pression tissulaire en oxygène ($PtiO_2$) reste actuellement la méthode la plus utilisée en clinique pour caractériser l'hypoxie cérébrale.

4.1 Mesure de la pression en oxygène (PO_2)

4.1.1. Mesure de pression tissulaire en oxygène ($Pti0_2$)

Il s'agit d'une mesure directe en continue de l'oxygénation tissulaire cérébrale à l'aide d'un cathéter inséré dans le parenchyme cérébral. Le site d'implantation de ce cathéter devient ainsi crucial puisque les données

recueillies concernent l'environnement immédiat de la sonde de $PtiO_2$. Deux techniques principales sont actuellement décrites : une est basée sur le principe de Clark et l'autre sur une méthode de mesure optique. L'électrode de Clark est consituée d'une membrane couvrant un bain d'électrolytes et 2 électrodes métalliques. Les molécules d'oxygène diffusent à travers une membrane et sont réduites par une cathode polarographique, entrainant la création d'un courrant éléctrique directement proportionnel à la concentration d'oxygène. La technique optique repose sur l'utilisation de capteurs optiques mesurant la concentration de substances par analyse de longueur d'onde. Les molécules d'oxygène induisent des réactions photochimiques et modifient ainsi les propriétés optiques d'une source lumineuse (Beynon, Kiening et al. 2012). La méthode optique ne consomme ainsi pas l'oxygène du milieu contrairement à la méthode de Clark. En clinique, le matériel le plus utilisé est la sonde Licox (Integra Neurosciences, Plainsboro, NJ), utilisant la méthode de Clark. Celle-ci s'est imposée comme une méthode fiable de mesure de l'oxygénation cérébrale, plus sensible que la $SvjO_2$ ou la NIRS (Haitsma et Maas, 2002). Cette méthode invasive nécessite l'implantation intracérébrale neurochirurgicale d'une sonde pour le recueil continu, au lit du patient, de la $PtiO_2$; la surface explorée par ce dispositif est de 18 mm² sur une profondeur de 7 mm. La $PtiO_2$ est la pression partielle en oxygène dans le liquide extra-cellulaire du cerveau et reflète la disponibilité de l'oxygène pour le métabolisme oxydatif (production d'ATP). Elle représente la balance entre l'apport et les besoins en oxygène et est influencée par la perfusion capillaire. La distance entre les capillaires et des possibles barrières à la diffusion de l'oxygène sont également à prendre en compte (Nortje et Gupta 2006). La $PtiO_2$ est donc la résultante de l'apport, du métabolisme et de la diffusion de l'oxygène dans le tissu cérébral (Rosenthal, Hemphill et al. 2008). L'interprétation de la $PtiO_2$ nécessite également un délai après son insertion afin de ne pas mesurer la $PtiO_2$ d'un tissu fraichement lésé par la pose du capteur. Ce délai en pratique clinique varie de 8 à 12 heures après l'insertion du cathéter.

Dans la deuxième partie de ce travail, le capteur de $PtiO_2$ utilisé est un capteur optique (Oxylite, Oxford Optronics, Oxford, Royaume-Uni). Cette méthode de mesure a été utilisée en expérimental pour mesure la PO_2 tissulaire chez le rat notamment (Nwaigwe, Roche et al. 2000; Doll, Davies et al.

2009). La valeur normale de la PO_2 chez le rat sprague-dawley était alors de 26 ± 5 mmHg dans le thalamus après une durée de stabilisation de 15 à 30 minutes (Nwaigwe, Roche et al. 2000).

4.1.2. Résonance paramagnétique électronique (RPE)

Il s'agit d'une méthode de mesure de la PO_2 complexe et non disponible en clinique pour l'instant. La RPE repose sur la détection des atomes dotés d'électrons non appariés, ce qui est le cas de l'oxygène. La RPE indirecte utilise la propriété paramagnétique de l'oxygène sur la relaxation d'autres éléments. La raie de résonance d'un produit paramagnétique exogène peut être élargie par la PO_2 environnante. Le produit paramagnétique injecté peut être des matériaux paramagnétiques solubles (nitroxides ou radicaux triaryl méthyl) ou sous forme de particules (lithium phthalocyanine, fusinite) avec une relation PO_2/relaxation T_2 plus ou moins complexe. Une image RMN est ensuite réalisée pendant l'excitation de la résonance RPE du produit de contraste paramagnétique (Matsumoto, Hyodo et al. 2008).

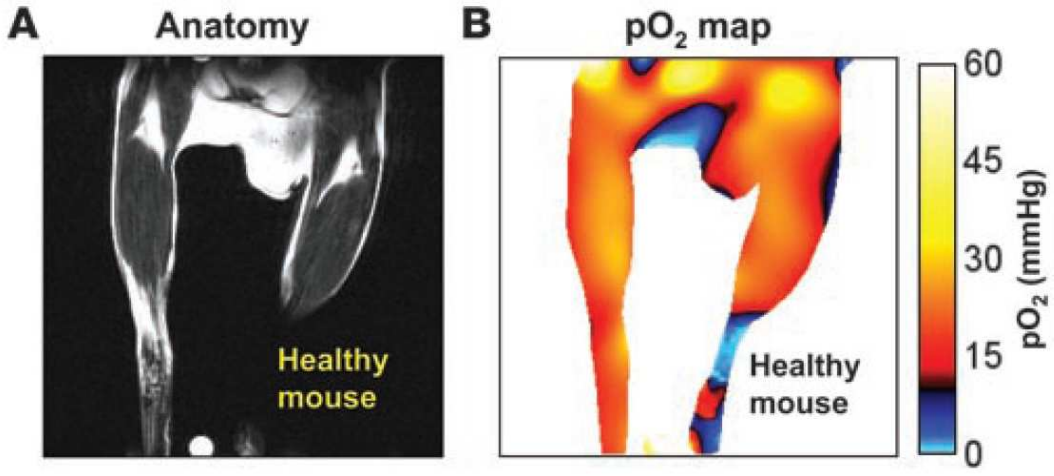


Figure 17 : cartographie de PO_2 musculaire chez une souris saine d'après matsumoto et al., 2008

4.1.3 Méthode IRM

Une relation linéaire entre la constante de relaxation longitudinale (R_1) du Fluor[19] contenu dans les perfluorocarbones et la PO_2 a pu être démontrée depuis le début des années 90 et l'utilisation de l'IRM au fluor (Barker, Mason et al. 1994). Cette propriété a pu être utilisée pour l'imagerie de la PO_2 de nombreux organes mais aussi de tumeurs (Le, Mason et al. 1997). Cette technique d'imagerie, néanmoins, n'est pas accessible chez l'homme, l'injection en intratissulaire de perfluorocarbones étant prohibée.

4.1.4 Marqueurs biologiques de l'hypoxie

Cette technique repose sur l'utilisation de marqueurs de l'hypoxie injectés *in vivo* comme les 2-nitroimidazoles en TEP (tomographie par émission de positons) ou le pimonidazole en immunohistochimie.

L'immunohistochime est basée sur l'utilisation d'anticorps mono- ou polyclonaux. Elle permet la détermination d'une hypoxie fiable puisque les marqueurs de l'hypoxie sont sélectivement réduits dans les cellules hypoxiques viables (alors que les électrodes mesurent la PO_2 sans distinction entre les zones hypoxiques et nécrotiques). Cette technique ne peut être utilisée que sur des biopsies cérébrales avec un marquage des zones hypoxiques pour des valeurs de $PO_2 < 10$ mmHg (Huang, Cheng et al. 2010). D'autres marqueurs de l'hypoxie immunohistochimiques sont disponibles avec pour point commun d'être régulé par le facteur inductible par l'hypoxie (*HIF*) comme l'anhydrase carbonique IX (CAIX) et le transporteur-1 du glucose (GLUT1) utilisé dans le cadre de l'étude de l'hypoxie tumorale (Hoskin, Sibtain et al. 2003).

Le premier marqueur nitroimidazole employé avec l'imagerie TEP est le fluoromisonidazole (^{18}F-MISO)(Rasey, Grunbaum et al. 1987). FMISO est hautement lipophile, capturé dans les cellules hypoxiques viables et sélectivement réduit par des nitroréductases. Cependant ce marqueur, du fait d'une clairance lente et de sa forte liposolubilité, pose des problèmes rapport signal sur bruit.

D'autres marqueurs indirects, à la clairance plus rapide et à la moindre liposolubilité ont donc été développés comme le ^{18}F-fluoroérythronitroimidazole, le fluoroétanidazole (FETA) et l'étanidazole penta-fluoride (EF-5).

4.2 Mesure de la SO_2

Des propriétés différentes magnétiques ou optiques entre l'oxy et la déoxyhémoglobine permettent de mesurer de manière non invasive la SO_2. Ces techniques sont représentées par la spectroscopie de proche infrarouge, la tomographie photoaccoustique ou l'IRM.

4.2.1 La spectroscopie de proche infra-rouge (NIRS)

La spectroscopie de proche infrarouge a la possibilité de mesurer la saturation cérébrale régionale en oxygène, et de fournir des informations sur le métabolisme oxydatif et le statut hémodynamique cérébral de manière non invasive. Elle pourrait s'intégrer dans le monitoring multimodal en neuroréanimation (voir revue dans *Francony, Bouzat et al. 2012)*. La NIRS exploite la propriété du spectre lumineux du proche infrarouge (700-1000 nm): à ce niveau de longueurs d'ondes, il offre une relativement bonne pénétration tissulaire (jusqu'à environ 8 cm) y compris pour l'os. La principale information délivrée par les modèles commerciaux de NIRS concerne l'oxygénation cérébrale grâce à la loi de Beer-Lambert qui permet la mesure de la concentration d'une substance en fonction de son degré d'absorption lumineuse selon l'équation (1):

$$A = \log(Ii/It) = \varepsilon.c.d \qquad (1)$$

où:

A: absorption

Ii: intensité lumineuse incidente

It: intensité lumineuse transmise

ε: coefficient spécifique d'extinction du composé mesuré (connu pour une longueur d'onde donnée)

c: concentration du composé mesuré

d: longueur du trajet lumineux.

L'intensité lumineuse décroit donc exponentiellement en fonction de la distance parcourue dans le milieu et de la concentration du composé étudié. Le coefficient spécifique d'extinction et la distance parcourue connus, on peut aisément déduire de l'atténuation la concentration d'un composé donné.

Dans le tissu cérébral, l'absorption lumineuse dépend de composés biologiques, les chromophores, dont les principaux sont l'hémoglobine sous sa forme oxygénée ou désoxygénée et la cytochrome oxydase. Ces chromophores possèdent en outre la propriété dans le spectre du proche infrarouge, d'avoir un spectre d'absorption variable en fonction de leur liaison avec l'oxygène, autorisant une séparation spectroscopique. La NIRS permet donc de déterminer les concentrations respectives d'oxyhémoglobine (HbO_2) et déoxyhémoglobine (Hb) d'où on peut en déduire la saturation régionale en oxygène de l'hémoglobine cérébrale ($rSO_2 = HbO_2/(HbO_2 + Hb)$). De plus, à la longueur d'onde de 810 nm, l'absorption de l'HbO_2 et de l'Hb sont identiques, autorisant la détermination d'une concentration totale d'hémoglobine cérébrale (HbT).

Cependant, la propagation lumineuse dans les milieux biologiques ne dépend pas seulement de l'absorption. Elle se trouve également sous l'influence de la réflexion (essentiellement dépendante de l'interface optode-surface tissulaire) et surtout de la dispersion. La dispersion lumineuse a 2 conséquences capitales: d'une part, elle représente la principale cause d'atténuation du signal lumineux (80% environ contre 20% pour l'absorption), d'autre part, elle provoque un allongement important et difficilement quantifiable du parcours lumineux. Cet allongement est représenté par un facteur correctif appelé DPF pour *differential pathlength factor*, ce qui permet d'obtenir la loi de Beer-Lambert modifiée, clef de voûte du calcul de la rSO_2 par la NIRS, selon l'équation (2):

$$A = \log(Ii/It) = \varepsilon.c.d.DPF + G \qquad (2)$$

où:

DPF: *differential pathlength factor*

G: autres facteurs d'atténuation, constants pour un tissu et une longueur d'onde donnés

Ces éléments de modification de l'atténuation constituent une importante limite de la genèse de données quantitatives par la NIRS: certes, les facteurs G sont éliminables par développement d'une équation différentielle (3) qui permet le calcul d'une proportion d'HbO_2 et d'Hb d'où une rSO_2:

$$(3)\ (AHbO_2 - AHb) = \varepsilon.(cHbO_2 - cHb).d.DPF$$

Cependant, le DPF ne peut qu'être estimé, et cette estimation constitue une partie des algorithmes propre à chaque instrument commercial de saturation cérébrale en O_2. La conséquence de ces approximations est que la rSO_2, en ce qui concerne la technologie de routine, ne peut être qu'une donnée semi quantitative, dont les tendances de variations sont plus fiables que les valeurs absolues. Ceci transparaît bien dans la variabilité inter individuelle et inter matériel des valeurs basales de rSO_2 (Thavasothy, Broadhead et al. 2002). De plus, toute variation de l'architecture tissulaire, fréquente en situation d'agression cérébrale (œdème, effet de masse, contusion...), est susceptible de mettre à mal les algorithmes d'évaluation du DPF, venant encore fragiliser la valeur absolue de la rSO_2.

4.2.2. La saturation veineuse jugulaire en oxygène ($SvjO_2$)

Le cathétérisme de la veine jugulaire interne pour mesurer la saturation cérébrale en oxygène du sang au niveau du bulbe jugulaire, permet la détermination du statut global de l'oxygénation cérébrale. Cette saturation est le reflet de l'adéquation du débit sanguin cérébral à la demande métabolique du cerveau. Une association statistiquement significative entre une $SvjO_2$ basse et un mauvais devenir neurologique a pu être démontrée après un TC (Gopinath, Robertson et al. 1994). Le principe de la $SvjO_2$ repose sur l'équation de Fick (4) :

$$(4)\quad SvjO_2 = SaO_2 - CMRO_2 / 1.34 \text{ x } DSC \text{ x } Hb$$

Avec $CMRO_2$: consommation en O_2 du cerveau

DSC : le débit sanguin cérébral

Hb : l'hémoglobine

Ainsi pour un hématocrite constant, une hémoglobine constante et une consommation en oxygène constante, les variations de la $SvjO_2$ peuvent être corrélées aux modifications du débit sanguin cérébral. La limite principale de cette technique réside dans son incapacité à détecter des lésions d'hypoxie focales. Kiening et coll ont ainsi montré une supériorité de la mesure de la $PtiO_2$ par rapport à la $SvjO_2$ pour le monitoring à long terme de l'oxygénation cérébrale (Kiening, Unterberg et al. 1996).

4.2.3 Tomographie photoaccoustique

Cette technique repose sur l'absorption de photons ultrasonores à travers l'effet photoaccoustique. Elle utilise des impulsions lasers de courtes durées dirigées vers un tissu vivant, induisant des modes ultrasonores large bande par expansion thermo élastique. L'amplitude de ces ondes dépend de l'énergie optique déposée localement, permettant un contraste d'absorption optique. En faisant varier la longueur d'onde du laser, il est possible de quantifier la concentration de plusieurs pigments présents dans un même tissu (Wang 2008). Il est donc possible d'imager le réseau vasculaire à 584 nm du fait d'une très bonne résolution spatiale (dispersion ultrasonore moins élevée que la dispersion optique) et de distinguer oxyhémoglobine et désoxyhémoglobine en utilisant 2 longueurs d'onde du proche infrarouge à l'intérieur de ce réseau (figure 18).

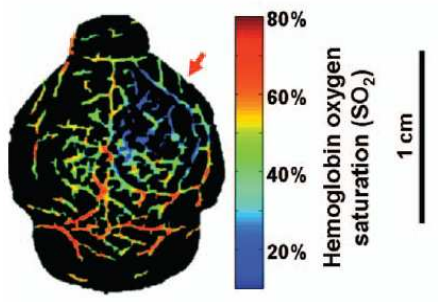


Figure 18 : Imagerie par tomographie photoaccoustique d'une souris nude porteuse d'un glioblastome (flèche) d'après wang et al, 2008.

Cette méthode reste cependant très peu répandue et n'autorise que l'exploration d'une profondeur de 1 mm.

4.3. Méthode de mesure la SO_2 à partir de l'effet BOLD

Cette méthode de mesure de la SO_2 constitue l'une des méthodes de détermination de l'oxygénation cérébrale post-traumatique utilisée dans la deuxième partie de cette thèse. Elle fait l'objet d'un développement continu au sein de l'équipe 5 du GIN (thèse de Thomas Christen, 2009) et repose sur la quantification des effets induits sur le signal RMN par le paramagnétisme de la molécule de déoxyhémoglobine (effet BOLD pour *blood oxygen level dependent*).

4.3.1. Caractère magnétique de l'hémoglobine

L'hémoglobine est constituée de 4 chaînes de globine et de 4 hèmes. L'oxygène se lie de façon réversible aux molécules de fer accueillies par chaque molécule d'hème. Le fer à l'état ferreux possède 6 électrons sur la dernière orbitale. Lorsque l'oxygène est lié à l'hémoglobine, celui-ci crée un fort champ magnétique provoquant un appariement des 6 électrons au niveau d'énergie le plus bas. Sans oxygène, les électrons des molécules de fer se répartissent entre deux niveaux d'énergie, laissant 4 électrons célibataires, ce qui confère à la déoxyhémoglobine sa propriété paramagnétique.

La susceptibilité magnétique caractérise la propriété d'un matériau à interagir avec un champ magnétique. La molécule d'oxyhémoglobine possédant la même susceptibilité magnétique que les tissus environnants, l'origine du contraste BOLD provient donc de la différence de susceptibilité entre le sang oxygéné et le sang désoxygéné. Celle-ci est égale à $0{,}264 \times 10^{-6}$ ppm (Spees, Yablonskiy et al. 2001) pour de l'hémoglobine humaine.

4.3.2. Principe de la méthode

L'effet BOLD dépend localement du rapport entre l'oxyhémoglobine et la déoxyhémoglobine qui est un agent paramagnétique, créant des inhomogénéités de champ magnétique local. En revanche la molécule d'hémoglobine saturée en oxygène est diamagnétique et donc ne crée pas de perturbation locale du champ. Ce contraste naturel est utilisé de manière

dynamique en IRM fonctionnelle mais peut être aussi utile pour l'évaluation du métabolisme basal du cerveau, désigné par l'appellation BOLD quantitatif. Ainsi, la saturation locale en O_2 est accessible par la RMN grâce à des mesures pondérées en T_2 (écho de spin) et en T_2* (écho de gradient). En effet la différence entre ces deux mesures repose principalement sur l'absence de rephasage dans la séquence T_2* qui la rend sensible aux inhomogénéités de champ magnétique dans les tissus. Cette propriété est couramment utilisée en imagerie par RMN pour diagnostiquer les lésions hémorragiques qui sont millimétriques mais apparaissent visibles par un hypo signal en T_2* grâce aux propriétés paramagnétiques de la déoxyhémoglobine. La combinaison de séquences de mesure de T_2 (qui ne sont pas perturbées par les inhomogénéités de champs magnétique) et de T_2* (qu'on aura par ailleurs corrigée des inhomogénéités macroscopiques de champ magnétique) permet d'approcher, dans certaines conditions, la quantité intra vasculaire de déoxyhémoglobine dans le voxel de parenchyme cérébral. La combinaison de cet effet BOLD avec la réalisation de cartographies quantitatives du Volume Sanguin Cérébral (VSC, *Blood Volume fraction*, *BVf*, par la mesure du T_2* avant et après l'injection d'un produit de contraste superparamagnétique) permet ensuite de déterminer la saturation locale en oxygène (ISO_2). Ces principes sont applicables en IRM à partir de 3 teslas (Christen, Lemasson et al. 2011).

Modélisation mathématique

Avec un champ magnétique élevé supérieur à 3T, le modèle mathématique de la décroissance du signal RMN décrit par Haacke et Yablonskiy est applicable (Yablonskiy et Haacke, 1994). Ce modèle est une étude statistique sur les perturbations du champ magnétique induites par un ensemble d'objets de susceptibilité connue, placés dans un volume donné et soumis à un champ magnétique extérieur. La modélisation des vaisseaux sanguins par des cylindres droits permet d'obtenir une équation analytique simple de l'évolution RMN du signal. Quelques millisecondes après l'excitation de spins, le signal théorique s'écrit (équation 5):

$$s(t) = Cte \cdot F(t) \cdot \exp(-R_{2t} \cdot t - BVf \cdot \gamma \cdot \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \Delta\chi_0 \cdot Hct \cdot (1 - lSO_2) \cdot B_0 \cdot t)$$

Avec Cte : une constante

F(t) : inhomogénéités macroscopiques du champ magnétique B_0

R_{2t} : $1/T_2$

BVf : Volume sanguin cérébral

Hct : Hématocrite microvasculaire

$\Delta\chi_0$: Différence de susceptibilité magnétique entre oxy et déoxyhémoglobine

lSO_2 : SO_2 locale

La méthode développée au laboratoire consiste à mesurer séparément les inhomogénéités macroscopiques de champ F(t), le volume sanguin BVf et le T_2 du tissu. Une fois ces paramètres connus, il ne reste dans l'équation que les termes Cte et lSO_2 à estimer. L'hématocrite microvasculaire est fixée à 0,357 (Christen, Lemasson et al. 2011), nécessitant l'application d'un facteur correctif à la lSO_2 mesurée, basé sur cet hématocrite.

<u>Correction des larges inhomogénéités de champ magnétique</u>

Les variations spatiales du champ B_0 comme les interfaces air/tissu près des cavités buccales chez le rat induisent des inhomogénéités de champ magnétique influençant la décroissance du signal RMN (Fonction F(t)). Deux méthodes existent pour corriger ces inhomogénéités de champ, la méthode retenue au sein du laboratoire (Christen, Lemasson et al. 2011) consiste à réaliser des acquisitions 3D haute résolution (Yang, Williams et al. 1998) préférée à l'établissement d'une carte d'inhomogénéités de champ B_0. Cette méthode consiste à utiliser une séquence d'écho de gradient multiple 3D (MGE3D) haute résolution (Figure 19e) au lieu d'une séquence d'écho de gradient multiple 2D (MGE2D). Les 20 signaux de décroissance du signal RMN sont représentés dans la figure 19f. La moyenne de ces données correspond à

l'image 19g. Le calcul du T_2 haute résolution corrigé est effectué sur l'exponentielle ajustée par ces données corrigées (Figure 19h).

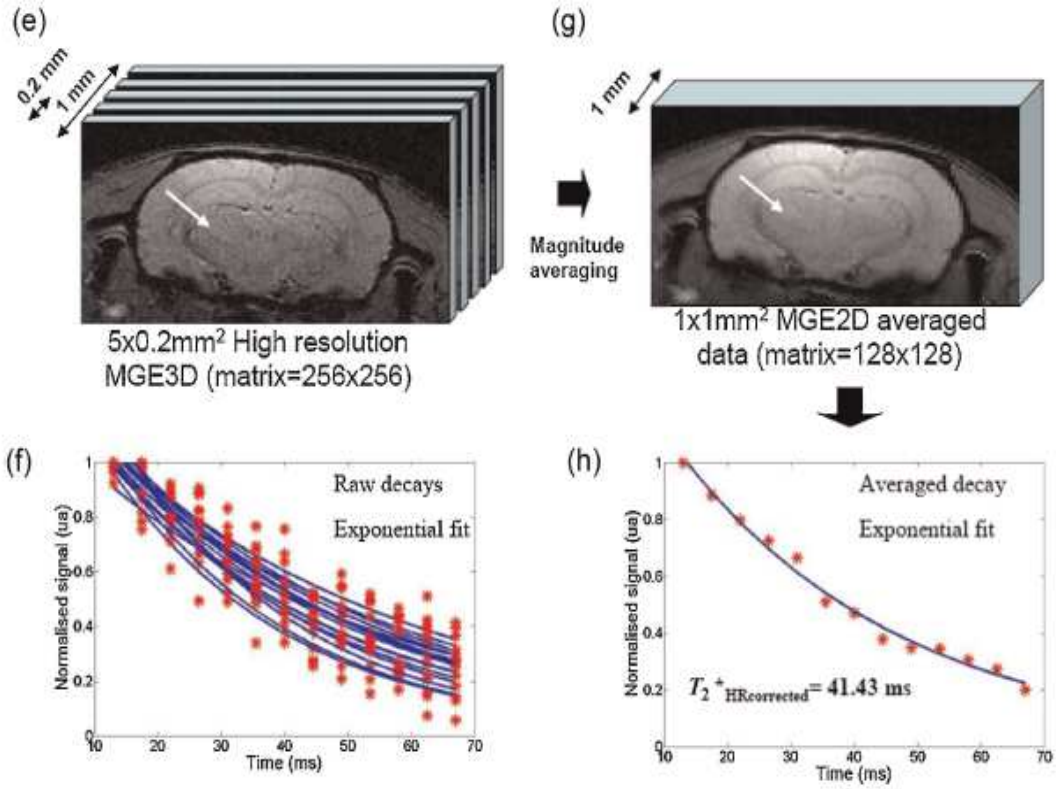


Figure 19 : principe de calcul du T_2* haute résolution corrigé d'après Christen et al 2011.

<u>Mesure du volume sanguin cérébral (VSC ou *Blood Volume fraction, BVf*)</u>

La technique utilisée dans la deuxième partie de ce travail repose sur l'injection d'un produit de contraste exogène et la mesure de la répartition de ce produit à l'état stationnaire (lorsque le produit est réparti de manière uniforme). Cette méthode est décrite par Irène Troprès (Tropres, Grimault et al. 2001), membre de l'équipe 5 du GIN et repose sur la mesure du R_2* (séquence MGE) avant et après l'injection d'un produit de contraste dont la susceptibilité est connue, selon l'équation 6 :

$$BVf = \frac{3}{4 \cdot \pi \cdot \gamma \cdot \Delta\chi_{USPIO} \cdot B_0} (R_2{}^*{}_{après} - R_2{}^*{}_{avant})$$

Avec $\Delta\chi_{USPIO}$ la susceptibilité magnétique de l'agent de contraste.

Mesure du temps de relaxation transverse

Le temps de relaxation T_2 est déterminé à l'aide d'une séquence classique IRM de multi écho de spin dont le chronogramme est décrit ci-dessous (Figure 20) :

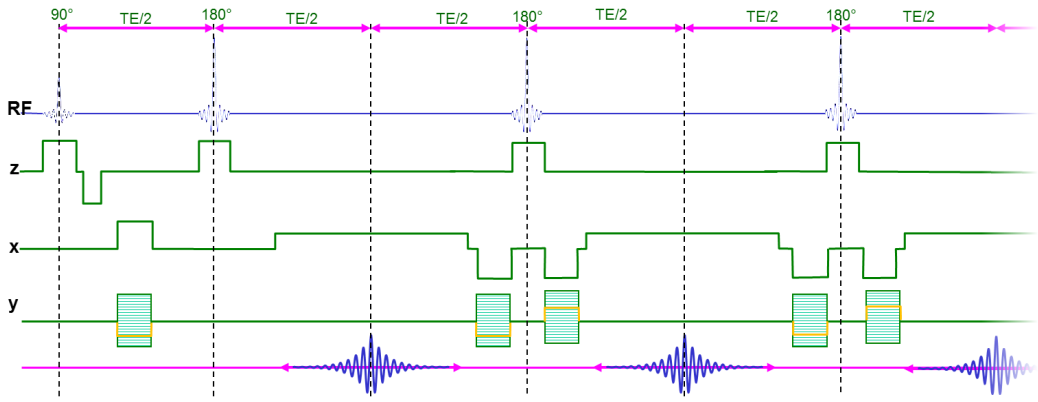
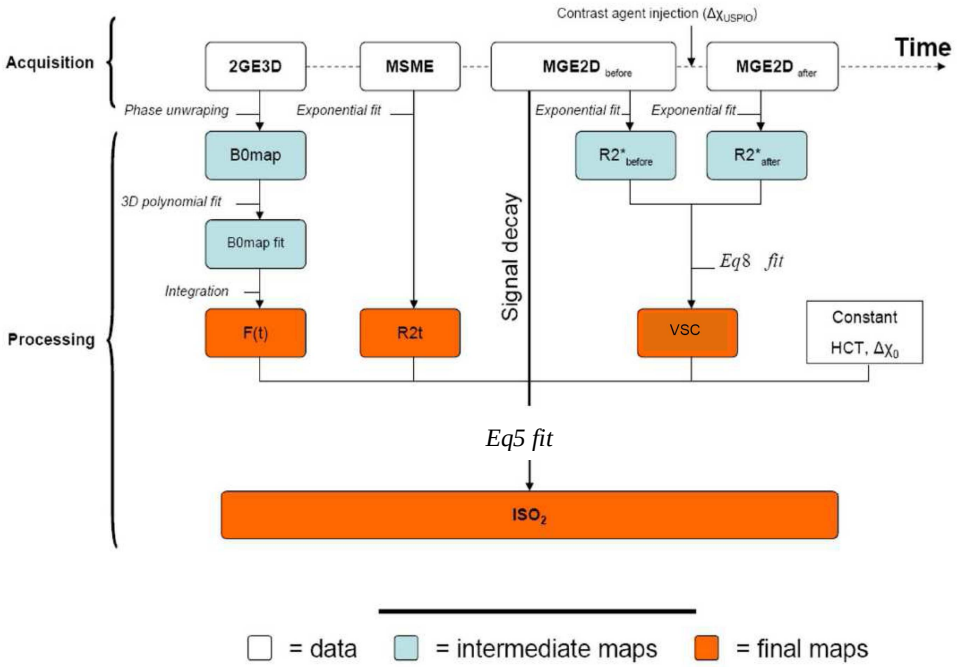


Figure 20 : Chronogramme de la séquence IRM de multi écho de spin

4.3.3. Protocole d'acquisition

Les acquisitions MGE sont réalisées à hautes résolutions spatiales (MGE3D). Une résolution spatiale identique à celle de la séquence MGE2D est obtenue en moyennant les données en amplitude. Ceci permet de corriger les effets induits par F(t). Dans ce cas, l'ajustement de l'équation ne tient donc pas en compte le terme F(t) (Figure 21). La cartographie de lSO_2 est donc obtenue en combinant les cartes de T_2 et de VSC, elle-même obtenue par le calcul du ΔR_2* (Figure 22).



$$s(t) = Cte.F(t).\exp\left(-R_{2t}.t - VSC\ .\gamma\frac{4}{3}.\pi.\Delta\chi_0.Hct.(1 - lSO_2).B_0.t\right)$$

Figure 21: Protocole d'acquisition utilisé dans la deuxième partie d'après la thèse de T. Christen.

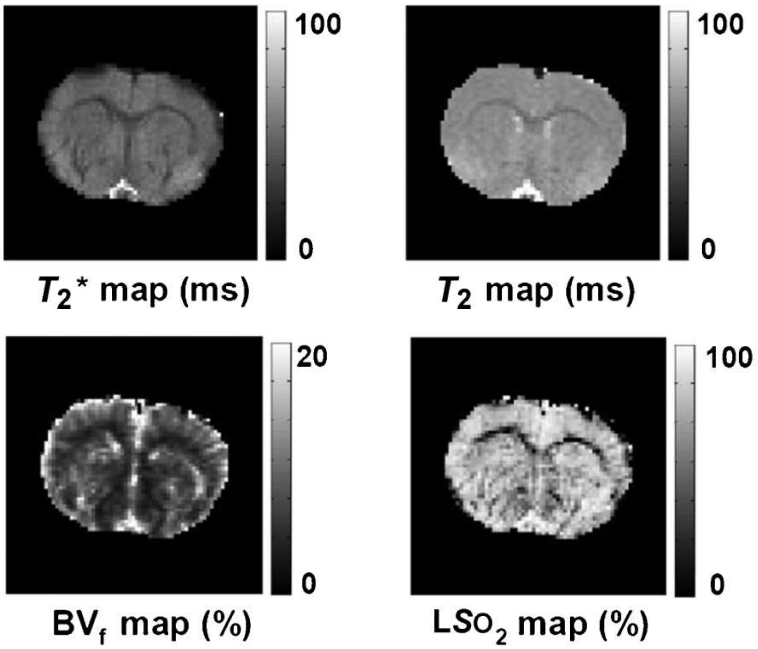


Figure 22: Exemples de cartes obtenues par le protocole d'acquisition d'après Christen et al., 2011.

4.4. Mesure de la $CMRO_2$

4.4.1. IRM ^{17}O

L'^{17}O est le seul isotope stable de l'oxygène qui peut être détecté par RMN. L'IRM ^{17}O *in vivo* possède 2 applications majeures pour étudier le fonctionnement cérébral et le métabolisme cérébral. La première application est de mesurer le DSC en mesurant la clairance de l'$H_2{}^{17}O$ dans le parenchyme cérébral après une injection intravasculaire d'un bolus d'$H_2{}^{17}O$. La seconde application permet de déterminer la $CMRO_2$ à travers la quantification de la formation de métabolites $H_2{}^{17}O$ dans le tissu cérébral à partir de l'inhalation d'^{17}O (Figure 23) (Zhu, Zhang et al. 2005).

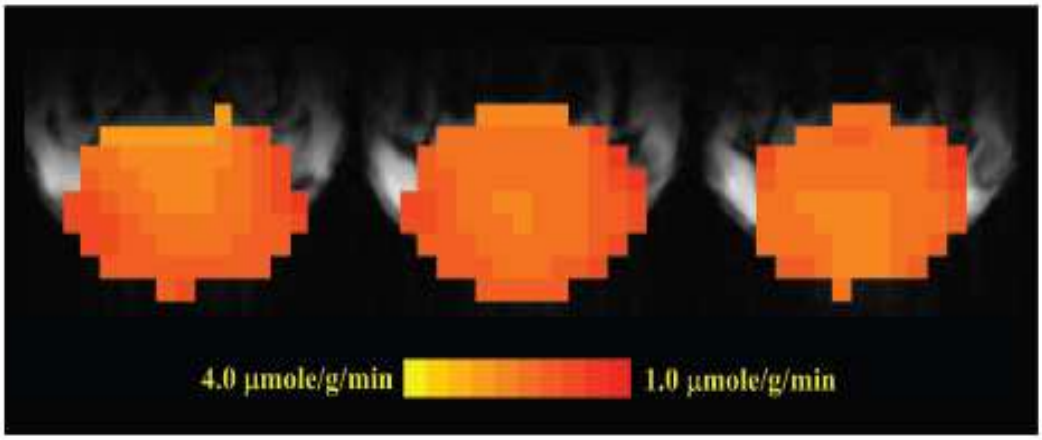


Figure 23 : Cartes de $CMRO_2$ d'un cerveau de rat obtenues après l'inhalation d'^{17}O d'après Zhu et al., 2005

Il existe 2 approches RMN pour mesurer l' $H_2{}^{17}O$ in vivo : une directe utilisant la détection par l'IRM ^{17}O et l'autre indirecte utilisant la RMN des protons pour mesurer les variations de T_2 et T_1 induites par le couplage scalaire entre les deux noyaux ^{1}H et ^{17}O. Ces méthodes nécessitent de travailler à champs magnétique élevé (>7T) et ne sont pas utilisées chez l'homme.

4.4.2. TEP ^{15}O

Le principe de cette technique est similaire avec le principe de l'IRM ^{17}O notamment pour la mesure du DSC. La différence méthodologique pour le calcul de la $CMRO_2$ repose sur l'impossibilité en TEP de discerner l'^{15}O lié à l'hémoglobine de l'^{15}O dissout dans le sang ou les tissus. Il est donc nécessaire d'avoir une fonction d'entrée artérielle pour déterminer le contenu artériel en ^{15}O ainsi que de déterminer le volume sanguin cérébral (VSC), par inhalation de $C^{15}O$ par exemple. La demi-vie de l'élément ^{15}O (environ 120 secondes) nécessite cependant de travailler à proximité d'un cyclotron et limite l'utilisation de cette technique.

4.4.3. IRM fonctionnelle (IRMf) quantitative

L'IRMf quantitative repose sur la quantification du signal BOLD pour *Blood Oxygen Level Dependent* (fonction du rapport oxy et désohyhemoglobine, développé dans le paragraphe : mesure de la SO_2 par l'effet BOLD) combiné à une mesure du DSC, selon l'équation ci-desous (Davis, Kwong et al. 1998) :

$$\frac{\Delta CMRO_2}{CMRO_{20}} = \left(1 - \frac{\Delta BOLD / BOLD_0}{M}\right)^{1/\beta} \left(\frac{CBF}{CBF_0}\right)^{1-\alpha/\beta} \quad (7)$$

M est le maximum théorique du signal BOLD, c'est-à-dire le signal BOLD que l'on mesurerait si toute la désoxyhémoglobine était éliminée du sang. α est l'exposant de la relation de Grubb qui relie le CBV au CBF (Grubb, Raichle et al. 1974). β est l'exposant avec lequel la concentration veineuse en désoxyhémoglobine influe sur la relaxivité apparente.

Cette méthode non-invasive utilise l'inhalation de CO_2 pour calibrer le signal BOLD (détermination du paramètre M) afin de faire varier le VSC sans modifier la $CMRO_2$. La deuxième étape de la méthode consiste à mesurer conjointement les variations de signal BOLD et de DSC lors de la modulation de l'activité neuronale (Figure 24). On obtient ainsi des informations sur la

variation de $CMRO_2$ ($rCMRO_2$) au cours d'une tâche. Cette approche ne permet pas cependant des cartes de $CMRO_2$ basale.

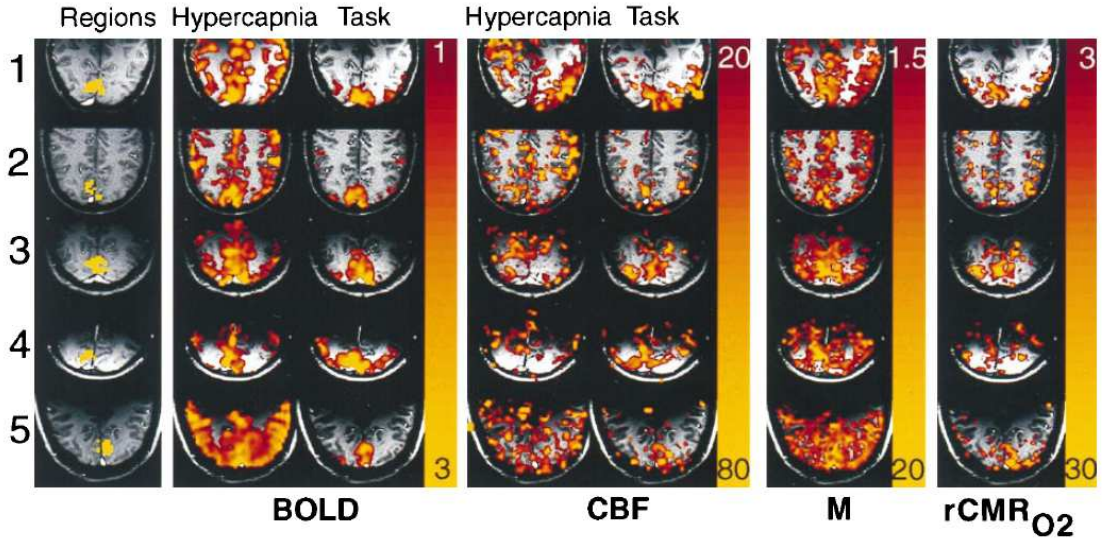


Figure 24 : Détermination par IRMf quantitative des variations de la $CMRO_2$ dans 5 régions d'intérêt en combinant l'effet BOLD, le calcul du CBF et la détermination du paramètre M d'après Davis et al, 1998.

5. Conclusion

L'hypoxie cérébrale post-traumatique est pluri factorielle, dépendante à la fois du débit sanguin cérébral, de la consommation en oxygène du cerveau et de la microcirculation cérébrale. L'interprétation des différents monitorages de l'oxygénation cérébrale doivent donc prendre en compte ces différents déterminants afin d'optimiser la prise en charge thérapeutique des patients et diminuer les séquelles neurologiques post-traumatiques. Le monitorage le plus utilisé actuellement en clinique reste la $PtiO_2$. La mesure de la SO_2 par IRM constitue cependant une modalité de mesure intéressante permettant une évaluation précise locale de l'oxygénation sur plusieurs coupes de cerveau.

CHAPITRE III

L'érythropoïétine et ses dérivés

Parmi un grand nombre de molécules testées dans des différents modèles de TC *in vitro* et *in vivo*, de nombreuses molécules ont révélé un effet neuroprotecteur en expérimentation animale. Cependant un nombre limité de ces molécules fait l'objet actuel d'essais cliniques. En 2012, les essais cliniques portent sur l'érythropoïétine (Epo), la minocycline, la cyclosporine, et la progestérone.

1. L'Erythropoïétine

1. 1. Le rôle de l'érythropoïétine endogène dans l'organisme

L'Epo est une sialoglycoprotéine constituée de 165 acides aminés, de poids moléculaire de 34kDa (Buemi, Cavallaro et al. 2003). Elle appartient à la famille des cytokines de type I. Son récepteur spécifique, R-Epo, est un homodimère de 66 à 74 kDa (Fisher, 2003). Initialement connue pour son rôle dans la maturation et la différentiation des cellules souches érythrocytaires, ses effets se sont peu à peu révélés pléïotropiques (Genc, Koroglu et al. 2004).

Pendant le développement fœtal, l'Epo est initialement produite par le foie. Juste après la naissance, cette production est effectuée par les cellules tubulaires et péri-tubulaires rénales (Fisher, 2003). La production d'Epo est principalement régulée par le facteur inductible par l'hypoxie HIF-1 qui agit comme facteur transcriptionnel vis-à-vis du gène de l'Epo. La présence d'oxygène permet l'hydrolyse d'HIF-1 via l'ubiquination de sa sous-unité alpha et entraîne l'absence de transcription du gêne de l'Epo alors qu'en situation d'hypoxie, l'absence de dégradation d'HIF-1 lui permet d'exercer son rôle de facteur transcriptionnel en se fixant sur la région promotrice du gêne de l'Epo au niveau du chromosome 7 (Marti, 2004). Une production d'Epo extra-rénale a pu être mise en évidence, plus particulièrement au niveau cérébral (Bernaudin, Bellail et al. 2000). De même, l'expression du R-Epo initialement découverte

sur les précurseurs érythrocytaires, a été aussi retrouvée sur de nombreuses autres cellules, par exemple les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, les cardiomyocytes, les entérocytes, les neurones et les astrocytes (Buemi, Cavallaro et al. 2003; Genc, Koroglu et al. 2004).

1.1.1. Effets hématologiques

L'Epo permet le développement de la lignée érythrocytaire en permettant la maturation des précurseurs érythrocytaires et en inhibant leur apoptose. La liaison de l'Epo avec son récepteur provoque l'activation de la Janus Tyrosine Kinase 2 (JAK2) qui propage le signal intra-cellulaire à l'aide de différents médiateurs dont la protéine STAT (Signal Transducer et Activator of Transcription), MAPK (ras-Mitogen-Activated Protein Kinase) et PI3K (Phophatidylinositol 3-Kinase) (Brines et Cerami, 2005). Ces mécanismes cellulaires, chez les précurseurs érythrocytaires, permettent :

-l'activation de protéines anti-apoptotiques de la famille des BCL2 (B-cell leukaemia/lymphoma 2) telles que la BCL-Xl (Brines et Cerami, 2005).

-l'activation du NF-κB, possédant une activité anti-apoptotique médiée par le PDGF et l'activation de MAPK (Ghezzi et Brines, 2004).

-la fermeture du pore mitochondrial de transition et l'inhibition des caspases (Brines et Cerami, 2005).

L'ensemble de ces mécanismes entraîne une inhibition des signaux intra-cellulaires pro-apoptotiques et donc la maturation de la lignée érythrocytaire.

1.1.2. Effets cérébraux

La présence d'Epo et du R-Epo ont pu être mises en évidence au niveau cérébral. La production d'Epo et l'expression de son récepteur sont alors assurées par les neurones, les astrocytes (Brines et Cerami, 2005) ainsi que les cellules endothéliales (Beleslin-Cokic, Cokic et al. 2004). L'expression de l'Epo endogène cérébrale et de son récepteur sont régulées également par le biais de l'hypoxie mais aussi par d'autres mécanismes comme l'hypoglycémie, une activité neuronale intense, la production d'insuline ou d'IGF (Ehrenreich, Aust et al. 2004). On peut détecter son expression dans le cerveau

embryologique humain, dans des biopsies humaines adultes de l'hippocampe et du cortex temporal ainsi que dans différentes parties du cerveau de singe.

L'Epo possède un rôle clé dans le développement embryologique du système nerveux central. Ainsi, la neutralisation de l'Epo et de son récepteur chez des embryons de souris ont conduit à des défauts d'embryogénèse du système nerveux central avec notamment des défauts de fermeture du tube neural (Tsai, Ohab et al. 2006). Le rôle de l'Epo endogène dans la maturation du système nerveux central serait en lien avec la stimulation de la différentiation et la prévention de l'apoptose des précurseurs neuronaux (Yu, Shacka et al. 2002).

L'Epo et son récepteur sont également présents au niveau cérébral à l'âge adulte et sont susceptibles d'augmenter avec une ischémie cérébrale. La production d'Epo cérébrale induite par l'ischémie est retardée et persisterait pendant au moins 24 heures entrainant la prolifération et la différenciation neuronale (Figure 25). Il semblerait que l'HIF-2, isoforme de l'HIF-1, soit le principal médiateur de l'expression d'Epo inductible par l'hypoxie (Warnecke, Zaborowska et al. 2004). L'expression du R-Epo est augmentée également dans la zone de pénombre de la zone cérébrale infarcie (Bernaudin, Marti et al. 1999).

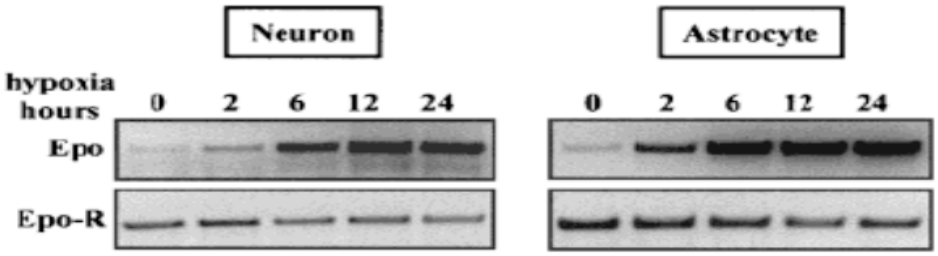


Figure 25 : Expression de l'Epo et du R-Epo en condition hypoxique d'après Bernaudin et al, 2000.

1.2. L'érythropoïétine exogène

Suite à la découverte du rôle cérébral de l'Epo endogène, l'érythopoïétine dans sa forme recombinante humaine (rh-Epo), déjà utilisée pour ses propriétés erythropoïétiques dans le traitement de l'anémie, est apparue une thérapeutique logique dans de nombreuses affections du système nerveux central (voir revue Velly, Pellegrini et al. 2010). Etant données les caractéristiques de la BHE et le poids moléculaire de la rh-Epo, la première administration de rh-Epo fût effectuée par voie intraventriculaire dans un modèle d'ischémie cérébrale (Sakanaka, Wen et al. 1998; Bernaudin, Marti et al. 1999). Cependant, l'administration de rh-Epo par voie systémique s'avéra également neuroprotectrice dans différents modèles expérimentaux d'agression cérébrale (Brines, Ghezzi et al. 2000), remettant en cause l'imperméabilité de la BHE pour ce composé. Ainsi, le passage de la rh-Epo à travers la BHE est une question cruciale pour l'utilisation d'Epo exogène en tant qu'agent neuroprotecteur.

Chez l'animal, différentes études attestent d'un passage de la rh-Epo à travers la BHE. Ainsi, l'injection intra-veineuse d'un complexe Biotine-Epo a permis la localisation de la biotine autour des capillaires du tissu cérébral de souris 5 heures après administration, suggérant un transporteur membranaire spécifique (Brines, Ghezzi et al. 2000). L'utilisation d'rh-Epo radiomarquée a démontré également que l'Epo est capable de traverser la BHE à une vitesse comparable à celle de l'albumine et que ce mécanisme est saturable. Un pic d'Epo est alors retrouvé 3 heures après l'administration (Banks, Jumbe et al. 2004). Ces constatations sont compatibles avec un transport transmembranaire de l'Epo par l'intermédiaire de ces récepteurs endothéliaux (Hasselblatt, Ehrenreich et al. 2006).

Chez les patients, de fortes doses d'Epo recombinante humaine intra-veineuses (1500 à 40 000 UI/kg) entraînent l'élévation du taux d'Epo présent dans le liquide céphalorachidien y compris après une injection unique avec une demi-vie similaire à celle du sérum (26-36 heures) (Xenocostas, Cheung et al. 2005). Cependant, le faible ratio de passage de la rh-Epo à travers la BHE

nécessite, pour obtenir un effet neuroprotecteur, l'utilisation de posologie supérieure à son utilisation pour le traitement de l'anémie.

1.3. Mécanismes cellulaires de la neuroprotection

Le R-Epo cérébral conférant les propriétés de protection cellulaire diffère de celui trouvé au niveau hématopoïétique sur les précurseurs érythrocytaires ; En effet ce récepteur est associé fonctionnellement avec d'autres récepteurs comme le CD 131. De plus, son affinité pour l'Epo concerne une zone différente de celle mise en jeu lors de son interaction avec le R-Epo présent sur la lignée érythrocytaire (Leist, Ghezzi et al. 2004).

Cependant, les mécanismes cellulaires restent identiques à ceux observés chez les précurseurs érythrocytaires (Brines et Cerami, 2005) et mettent également en jeu la protéine BCl-X (Kilic, Kilic et al. 2005) et la protéine STAT (Um et Lodish 2006). Dans les cellules neuronales, la fixation de l'Epo sur son récepteur entraîne la phosphorylation et l'activation de la JAK2 kinase. La JAK2 activée initie la transduction du signal grâce à différentes protéines comme la protéine Src Homology Containing (SHC), la protéine Growth factor Receptor-Binding 2 (GRB 2), la protéine Son of Sevenless-1 (SOS-1), la phosphoinositol 3-kinase (PI3-K), la protéine STAT-5 et la NF-κB (Noguchi, Asavaritikrai et al. ; Ponce, Navarro et al. 2012). L'ensemble de ces mécanismes cellulaires conduit à l'inhibition de signaux pro-apoptotiques et à l'activation de gènes favorables à la survie cellulaire (Figure 26).

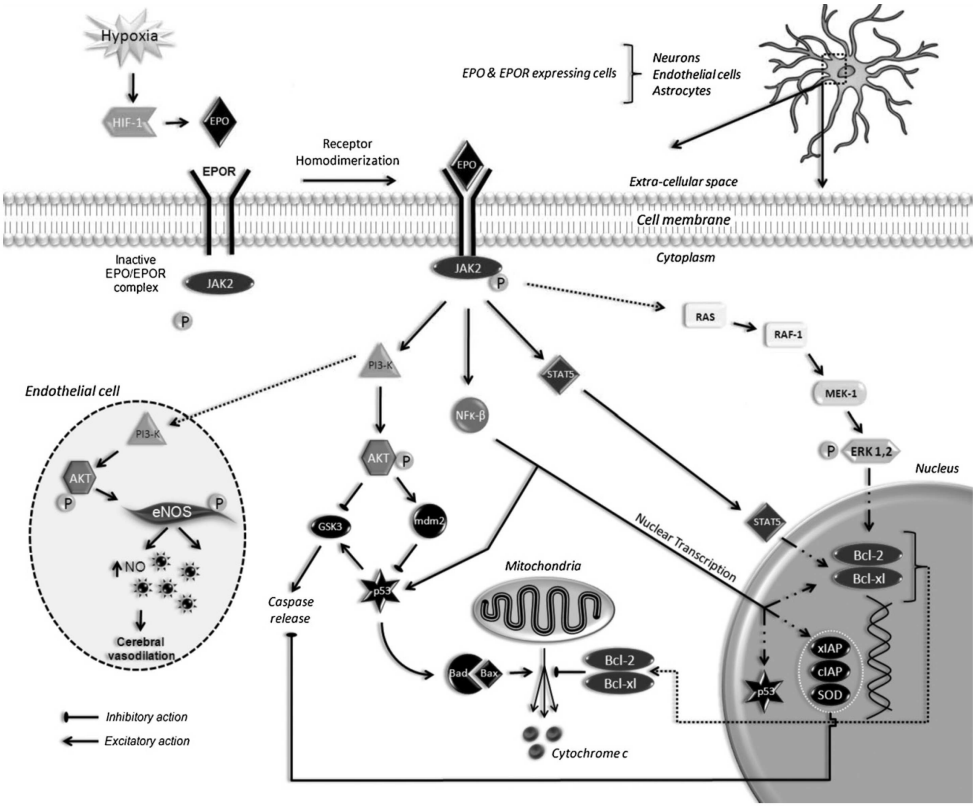


Figure 26 : Signalisation intracellulaire suite à la fixation de l'Epo sur son récepteur d'après Ponce et coll, 2012.

L'effet anti-apoptotique n'est pas la seule composante de la neuroprotection ; la fixation de l'Epo avec son récepteur permet en effet de réguler les influx calciques via la protéine lipase C (PLC) (Assandri, Egger et al. 1999) et de moduler par ce biais le relargage de neurotransmetteurs, celui de la dopamine étant favorisé (Marti, 2004) alors que celui du glutamate est fortement diminué (Kawakami, Sekiguchi et al. 2001). Cette action rend compte de l'effet bénéfique de l'Epo vis-à-vis de l'excitotoxicité.

Une part importante de la neuroprotection liée à l'Epo s'effectue par son action sur les cellules endothéliales. En effet, l'Epo favorise la prolifération, la migration des cellules endothéliales et mobilise les précurseurs des cellules endothéliales. L'ensemble de ces mécanismes constitue l'angiogénèse permettant l'augmentation de la vascularisation des zones où l'Epo est exprimée, i.e. les zones hypoxiques ou ischémiques. Cette angiogénèse

explique l'augmentation du volume vasculaire au sein du tissu péri-ischémique chez des souris traitées par Epo (Wang, Zhang et al. 2004).

Un autre mécanisme neuroprotecteur de l'Epo fait intervenir le NO. L'Epo peut réguler la production endothéliale et neuronale de NO. En condition hypoxique, cette cytokine augmente l'activité de la NO synthétase, donc la production de NO ainsi que la vasodilatation NO-dépendante (Kanagy, Perrine et al. 2003) chez le rat. Cette production de NO, dans le compartiment vasculaire, vise également à augmenter la vascularisation des zones lésées. Au niveau tissulaire, le NO exerce une action oxydative agressive pour les cellules, de la même manière que les radicaux libres. Cependant, l'Epo et l'activation de son récepteur sont capables d'inhiber la NO synthase inductible réduisant par ce biais les dommages oxydatifs provoqués par le NO et ses dérivés cytotoxiques (Yamasaki, Mishima et al. 2005). De plus, certaines enzymes anti-oxydantes sont activées, comme la superoxyde dismutase ou la glutathion peroxydase (Kumral, Gonenc et al. 2005).

L'Epo exerce également une action sur la neurogénèse. En effet par le biais de l'activation de la metalloproteinase matricielle 2 (MMP2) et de la MMP9 au sein des cellules endothéliales, l'Epo provoque la migration des neuroblastes dans les zones ischémiques (Wang, Zhang et al. 2006).

L'interaction entre Epo et BHE ne se limite pas qu'à un simple transport. En effet, dans un modèle bovin de BHE, l'Epo semble protéger la BHE contre l'action du Vascular Endothélial Growth Factor (VGEF) (Martinez-Estrada, Rodriguez-Millan et al. 2003). *In vivo*, la rh-EPO a été également capable de protéger la rupture de BHE secondaire à une ischémie cérébrale expérimentale en préservant l'expression de protéines jonctionnelles (Li, Lu et al. 2007).

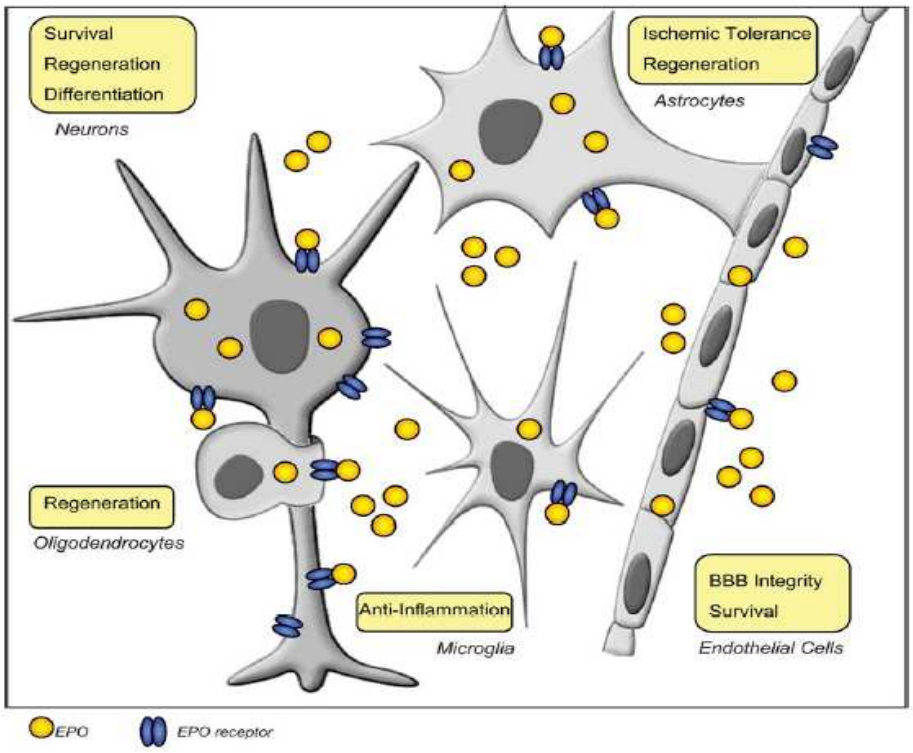


Figure 27 : Résumé des mécanismes neuroprotecteurs d'après Hasselblatt et al, 2006.

1.4. Erythropoïétine recombinante humaine et neuroprotection

1.4.1 Etudes expérimentales

L'action neuroprotectrice de l'Epo repose sur de nombreux mécanismes cellulaires (inhibition de l'apoptose dans les tissus adjacents à la lésion, lutte contre l'excitotoxicité, protection de la BHE et activation de l'angiogénèse et de la neurogénèse). Ainsi de nombreuses études expérimentales *in vivo* ont pu mettre à profit ces effets neuroprotecteurs dans de nombreuses pathologies.

Dans des modèles d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne, de nombreuses études expérimentales attestent de l'effet neuroprotecteur de l'Epo quelle soit administrée par voie intraventriculaire (Sakanaka, Wen et al. 1998; Bernaudin, Marti et al. 1999), intrapéritonéale (Brines, Ghezzi et al. 2000; Wang, Zhang et al. 2004; Aluclu, Acar et al. 2007; Esneault, Pacary et al. 2008), intranasale (Yu, Xu et al. 2005; Fletcher, Kohli et al. 2009) ou intraveineuse (Villa, van Beek et al. 2007; Wang, Zhang et al. 2007). L'ensemble de ces

études animales ont montré une diminution du volume cérébral infarci et une amélioration des scores neurocomportementaux par l'administration d'Epo. L'Epo utilisée dans ces différentes études était la rh-Epo à des doses variables de 500 à 5000 UI/Kg. L'importance de l'Epo endogène a pu être également démontrée par l'administration de R-Epo soluble neutralisant l'Epo endogène et entraînant une augmentation du volume cérébral infarci (Sakanaka, Wen et al. 1998).

Dans le traumatisme crânien, l'Epo a largement montré son intérêt dans différents modèles expérimentaux de TC: impact-accélération (Yatsiv, Grigoriadis et al. 2005; Verdonck, Lahrech et al. 2007; Valable, Francony et al. 2010), impact cortical contrôlé (Brines, Ghezzi et al. 2000; Lu, Mahmood et al. 2005; Cherian, Goodman et al. 2007; Xiong, Lu et al. 2008; Xiong, Mahmood et al. 2008; Xiong, Chopp et al. 2009) et cryolésion pariétale (Siren, Radyushkin et al. 2006; Grasso, Sfacteria et al. 2007). L'administration d'Epo était effectuée jusqu'à 24H après le TC. L'évaluation histologique démontrait une réduction du volume contus (Figure 28), une diminution des pertes cellulaires au niveau de l'hippocampe (Brines, Ghezzi et al. 2000; Cherian, Goodman et al. 2007; Xiong, Lu et al. 2008; Xiong, Mahmood et al. 2008) ainsi qu'une diminution de l'œdème cérébral (Figure 29) (Verdonck, Lahrech et al. 2007; Valable, Francony et al. 2010).

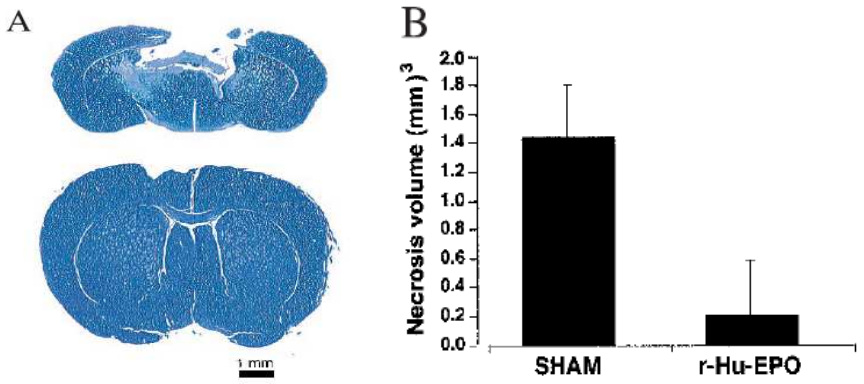


Figure 28 : Diminution des dommages cérébraux après TC d'après Brines et al, 2000

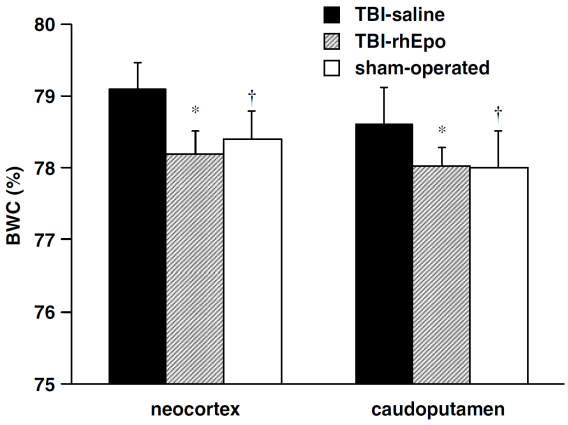


Figure 29 : Diminution de l'OC post-traumatique en gravimétrie d'après Verdonck et al, 2007.

L'évaluation neurocomportementale retrouvait une diminution des déficits moteurs, une restauration des fonctions cognitives (Yatsiv, Grigoriadis et al. 2005) ainsi qu'une amélioration de la mémorisation spatiale (Lu, Mahmood et al. 2005). Les effets neuroprotecteurs de la rh-Epo étaient associés avec une diminution de l'apoptose (Yatsiv, Grigoriadis et al. 2005) concomitante d'une augmentation de l'expression du gène anti-apoptotique BCL-2 (Liao, Zhi et al. 2008). Des propriétés anti-inflammatoires ont été également démontrées avec une diminution de la sécrétion d'IL-1β et de TNF-α (Yatsiv, Grigoriadis et al. 2005). Une diminution de la synthèse du NO a également été rapportée (Cherian, Goodman et al. 2007; Valable, Francony et al. 2010) ainsi que des propriétés anti-oxydantes (Ozturk, Demirbilek et al. 2005). L'effet neuroprotecteur de l'Epo implique sa liaison au R-Epo puisque ces effets disparaissent chez des souris KO pour ce récepteur (Xiong, Mahmood et al. 2008). En utilisant ce même modèle les mêmes auteurs ont démontré que les propriétés neuroprotectrices post-traumatiques pourraient être liées à une fixation de l'Epo avec le R-Epo endothélial (Xiong, Mahmood et al. 2010).

L'effet neuroprotecteur de l'Epo a pu être également établi dans d'autres pathologies comme l'hémorragie sous-arachnoïdienne (HSA). Ainsi l'Epo pourrait devenir un traitement du vasospasme par le biais de son action vasodilatatrice NO-dépendante sur les cellules endothéliales (Santhanam, Smith et al. 2005). D'autres modèles ont également montré des effets bénéfiques de l'Epo comme l'hypoxie néonatale (Sun, Calvert et al. 2005) ou le status epilepticus (Chu, Jung et al. 2008).

Dans la pathologie infectieuse, une réduction de la réponse inflammatoire a pu être mise en évidence dans des atteintes infectieuses neuroméningées comme le neuropaludisme (Kaiser, Texier et al. 2006). L'effet bénéfique de l'Epo serait alors lié à l'inhibition de la surexpression du TNF alpha et de l'interféron gamma.

1.4.2. Etudes cliniques

Dans la pathologie ischémique, l'ensemble des résultats expérimentaux a permis la réalisation précoce d'une étude clinique de phase II incluant 40 patients porteurs d'AVC ischémiques. Une injection quotidienne pendant 3 jours de 33 000 UI/kg de rh-Epo révéla alors une diminution du volume infarci en IRM sans effets indésirables manifestes ainsi qu'une meilleure récupération fonctionnelle à 1 mois (figure 30) (Ehrenreich, Hasselblatt et al. 2002).

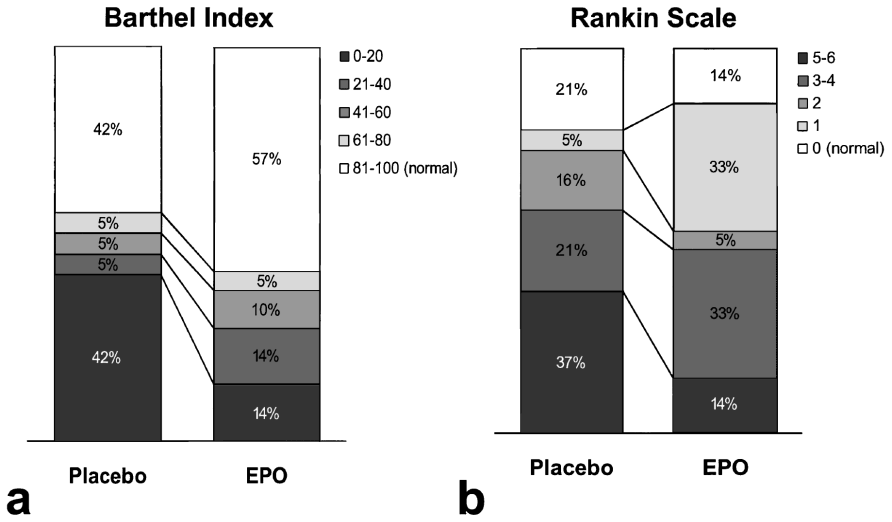


Figure 30 : Amélioration des scores fonctionnels neurologiques d'après Ehrenreich et al, 2002.

Ces résultats encourageants ont conduit à la mise en place d'un essai multicentrique en Allemagne incluant 522 patients avec un AVC ischémique (Ehrenreich, Weissenborn et al. 2009). Les résultats de cette étude ont été cependant décevants retrouvant une plus forte mortalité dans le groupe traité par Epo en lien avec une interaction probable entre la thrombolyse et l'Epo augmentant le nombre de saignements intracérébraux.

Dans la pathologie traumatique, il n'existe pour le moment pas d'étude achevée étudiant directement l'effet de l'Epo sur le TC. Cependant, une étude rétrospective récente montra que les patients avec un TC grave traités par Epo en raison d'une anémie avaient une diminution de leur mortalité hospitalière en comparaison avec des patients témoins (Talving, Lustenberger et al. 2010). De même, dans une étude de phase II, dont l'objectif était d'étudier les effets de l'Epo comme agent erythropoïétique chez des patients de réanimation, une diminution de la mortalité du sous-groupe admis pour traumatisme a été démontrée (Corwin, Gettinger et al. 2002). Cette étude s'est poursuivie par une plus large étude de phase III montrant que l'administration hebdomadaire de rh-Epo diminuait la mortalité des patients traumatisés (Corwin, Gettinger et al. 2007). Une plus grande incidence des thromboses veineuses profondes a cependant été retrouvée également chez les patients traités par rh-Epo. Enfin, une étude multicentrique internationale, randomisée contre placébo, est actuellement en cours dans le TC avec l'epoïétine alpha à la dose de 40000 UI 1 fois par semaine pendant 3 semaines (ClinialTrials.gov : NCT00987454).

Enfin dans l'HSA, 2 études mono-centriques de phase II ont été menées pour étudier l'efficacité et l'innocuité de l'administration de rh-Epo dans les 72H qui suivent une HSA par rupture anévrismale. La première étude fût négative (Springborg, Moller et al. 2007). La deuxième plus positive retrouva une diminution de l'incidence des vasospasmes sévères et des déficits ischémiques retardés sans montrer de différence de devenir neurologique à 6 mois cependant (Tseng, Hutchinson et al. 2009). Enfin, l'administration de rh-Epo à la dose de 30 000 UI pendant 3 jours a permis l'amélioration de la $PtiO_2$ chez 22 patients avec un vasospasme sévère (Helbok, Shaker et al. 2012).

1.5. Les effets indésirables de l'érythropoïétine

L'Epo utilisée dans sa forme recombinante possède des effets délétères même à sa posologie habituelle. En particulier, l'administration d'Epo augmente les complications thromboemboliques (Bennett, Silver et al. 2008; Bohlius, Schmidlin et al. 2009). Ces effets indésirables sont liés à l'augmentation de l'hématocrite et de la viscosité sanguine mais aussi à une activation

plaquettaire Epo-induite (Leyland-Jones 2003). La rh-Epo augmente ainsi l'expression du facteur tissulaire dans la matrice extra cellulaire endothéliale augmentant l'adhésion des plaquettes aux tissus lésés (Fuste, Serradell et al. 2002).

L'Epo induit également une augmentation de la pression artérielle chez certains patients par une production excessive d'endothéline-I (Miyashita, Tojo et al. 2004).

Un autre effet indésirable majeur de l'Epo est sa capacité à promouvoir le développement de tumeurs. Cette action n'est pas seulement liée à une action sur la tumeur elle-même mais aussi à une prolifération de néo-vaisseaux péri-tumoraux (Hardee, Cao et al. 2007). Ces effets indésirables pro-tumoraux ont fait l'objet d'une alerte dans le *New England Journal of Medicine* (Khuri, 2007).

Enfin, la rh-Epo est capable d'induire, comme toute molécule exogène, des réactions auto-immunes sources d'aplasie ou d'anémie (Carson, Evens et al. 2005).

Les doses utilisées en neuroprotection sont ainsi 10 fois supérieures aux doses classiques utilisées dans l'anémie ; les effets indésirables décrits sont donc fortement attendus questionnant sur la réelle relevance clinique de l'utilisation de l'Epo à de telles doses. L'ensemble de ces effets indésirables a conduit à la recherche de dérivés de l'Epo possédant des effets protecteurs pour les tissus sans effets indésirables hématopoïétiques.

2. L'Erythropoïétine carbamylée (CEpo)

2.1. Principe de synthèse

Le récepteur à l'Epo responsable de la neuroprotection est structurellement différent du récepteur de l'érythropoïèse (Brines, Grasso et al. 2004). Sur la base de cette observation, il est licite de penser que des modifications structurelles de l'Epo peuvent neutraliser son effet sur l'érythropoïèse sans altérer sa faculté de protéger les tissus. La carbamylation des lysines est un processus bien connu pour altérer la conformation et la

fonction d'une protéine. La CEpo est ainsi obtenue par carbamylation des lysines de l'Epo en homocitrulline (Leist, Ghezzi et al. 2004).

2.2. Mécanismes cellulaires impliqués

La CEpo n'a pas d'affinité pour le récepteur classique de l'érythropoïèse mais pour le récepteur à l'Epo (R-Epo) interagissant avec la sous-unité du récepteur commun Beta (βcR) appelée CD131 (Brines, Grasso et al. 2004). Cette affinité de la CEpo a pu être mise en évidence grâce à l'utilisation de souris KO pour le récepteur βcR.

Concernant les mécanismes cellulaires impliqués, il existe un grand degré d'incertitude. Les voies cellulaires impliquées dans la protection des tissus ne semblent pas passer par la phosphorylation des protéines STAT-5 et Jak2 contrairement à l'EpoR classique de l'érythropoïèse (Leist, Ghezzi et al. 2004). La voie PI3K/Akt semble par contre être activée par la CEpo (Xu, Cao et al. 2009) dans un modèle d'ischémie myocardique chez la souris. Cette activation de la voie PI3K/Akt a été également retrouvée dans un modèle d'ischémie-reperfusion rénale (Imamura, Isaka et al. 2006). La voie PI3K/Akt est notamment impliquée dans la modulation des phénomènes inflammatoires dans un modèle de choc endotoxinique chez la souris (Guha et Mackman 2002), ainsi l'activation de cette voie de signalisation intracellulaire pourrait interférer avec les phénomènes inflammatoires secondaires aux lésions tissulaires. Cependant cette voie cellulaire ne rend pas compte de tous les mécanismes mis en jeu par l'interaction de la CEpo avec son récepteur et d'autres voies de signalisation intracellulaire doivent être mises en jeu.

Concernant le passage de la CEpo à travers la BHE, l'injection intra-veineuse de 44µg/Kg de CEpo chez le rat sain s'accompagne d'une élévation de la concentration de CEpo dans le LCR de manière similaire à l'Epo (Leist, Ghezzi et al. 2004).

2.3. Etudes expérimentales

L'existence d'une Epo spécifique de la protection tissulaire constitue un espoir thérapeutique pour une application clinique ultérieure. Ainsi de nombreux modèles expérimentaux ont exploré les propriétés de la CEpo pour limiter les dommages tissulaires.

2.6.1. Ischémie cérébrale

Leist et coll. ont été les premiers à décrire les effets d'un traitement par CEpo dans un modèle d'ischémie cérébrale (occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne chez le rat) (Leist, Ghezzi et al. 2004). L'administration de CEpo 1h ou 4h après l'occlusion du vaisseau à la dose de 50 µg/Kg a permis ainsi de réduire le volume cérébral infarci. Ces résultats ont été confirmés ensuite par la même équipe (Villa, van Beek et al. 2007) dans un modèle d'ischémie cérébrale focale, retrouvant une diminution du volume cérébral infarci ainsi qu'une amélioration des fonctions sensitivomotrices. Une réduction de la neuroinflammation était également retrouvée en mesurant l'activation microgliale et l'infiltration leucocytaire. Wang et coll utilisèrent également des scores d'évaluation neurocomportementaux jusqu'à 28 jours après une ischémie cérébrale par mécanisme embolique (Wang, Zhang et al. 2007) afin de démontrer l'effet de la CEpo sur le devenir neurologique. Enfin Lapchak et al, dans un modèle d'ischémie cérébrale chez le lapin, ont également montré une amélioration des scores neurologiques après administration de CEpo à la dose de 50 µg/Kg 1h, 3h ou 6h après l'ischémie (Lapchak, Kirkeby et al. 2008).

2.3.1. Traumatisme crânien

La première description des propriétés neuroprotectrices de la CEpo en traumatologie revient à Mahmood et coll. dans un modèle d'impact cortical contrôlé (Mahmood, Lu et al. 2007). L'injection de CEpo à la dose de 50 µg/Kg en intra-péritonéal à la 6ème ou 24ème heure après le TC permit d'améliorer la mémorisation des rats traités par CEpo (labyrinthe de Morris) ainsi que

d'augmenter le nombre de cellules prolifératives dans le gyrus denté. Dans un modèle de TC *in vitro*, Adembri et coll démontrèrent également une diminution de la mort cellulaire post-traumatique (Adembri, Massagrande et al. 2008). Enfin, Xiong et al. avec le même modèle d'impact cortical contrôlé ont démontré une amélioration de scores comportementaux ainsi qu'une diminution des lésions tissulaires en histologie avec une administration de CEpo itérative (3 injection à 6H, 24H et 48H post-TC) *versus* une seule injection 6 heures après le TC (Figure 31) (Xiong, Mahmood et al. 2011).

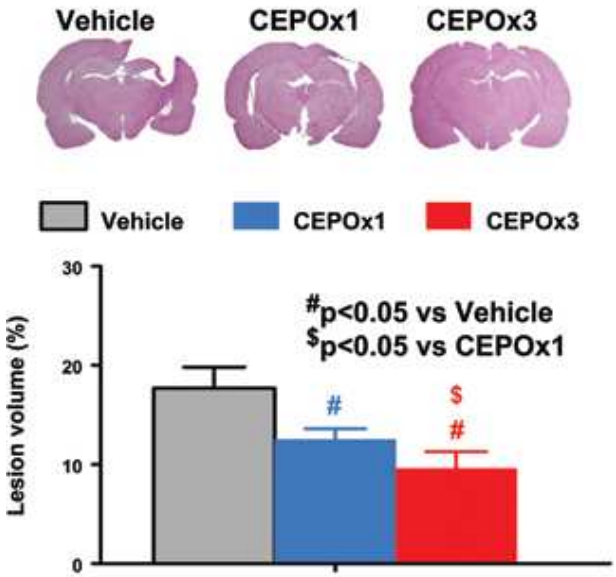


Figure 31 : Volume lésionnel mesuré en histologie chez des rats TC-placebo (Vehicle), TC-CEpo dose unique (CEPO x 1) et TC-CEpo trois injections (CEPOx3) d'après Xiong et coll, 2011.

2.3.2. Cardioprotection

La première étude traitant de la cardioprotection par la CEpo utilisa un modèle d'ischémie myocardique *in vivo* et démontra que la CEpo injectée à la dose de 50 µg/Kg une fois par jour pendant 7 jours pouvait diminuer la perte de cardiomyocytes post-ischémique (Figure 32) et améliorer les performances cardiaques mesurées par échocardiographie (Fiordaliso, Chimenti et al. 2005).

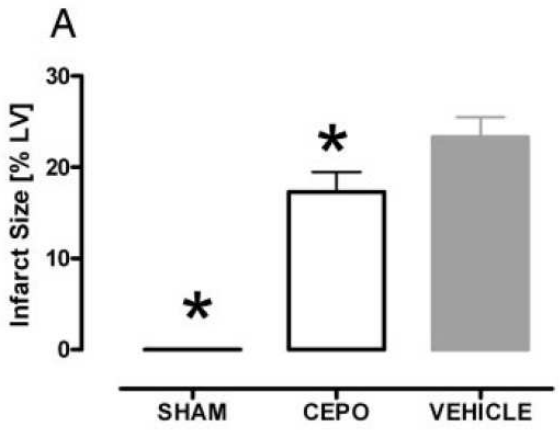


Figure 32 : Taille de l'infarctus du myocarde chez des rats témoins sans ischémie (Sham), avec ischémie traités par CEpo (CEpo) et avec ischémie mais sans traitement (Vehicle) d'après Fiordasilo et coll, 2005.

Cette étude a été ensuite confirmée par deux autres études expérimentales (Moon, Krawczyk et al. 2006; Xu, Cao et al. 2009) utilisant une injection de CEpo à la dose de 30 µg/Kg et 100 µg/Kg respectivement.

2.3.3. Autres modèles expérimentaux

Parmi les autres cibles thérapeutiques potentielles, deux sont particulièrement exploitées. Il s'agit du traumatisme médullaire et de la neuropathie diabétique.

Dans un modèle de compression de moelle épinière chez le rat, Leist et coll. ont montré une amélioration des scores moteurs par l'administration itérative de CEpo à la dose de 10 µg/Kg (0, 24 et 72 heures) (Leist, Ghezzi et al. 2004). Ces résultats ont été confirmés dans un modèle d'hémisection de moelle épinière, retrouvant une diminution des lésions de 36% par rapport au groupe de rats témoins (King, Averill et al. 2007). Dans un modèle génétique de dégénérescence de motoneurones, l'administration chronique de CEpo a également entrainé une diminution des motoneurones détruits (Mennini, De Paola et al. 2006).

Concernant la neuropathie diabétique, deux études expérimentales ont montré un effet analgésique de la CEpo (Leist, Ghezzi et al. 2004) et une prévention de la dystrophie nerveuse (Schmidt, Green et al. 2008).

D'autres modèles ont également été utilisés comme l'encéphalite auto-immune (Leist, Ghezzi et al. 2004), la neuropathie périphérique à la Cisplatine (Bianchi, Brines et al. 2006), les lésions cérébrales radioinduites (Erbayraktar, de Lanerolle et al. 2006) ou l'ischémie-reperfusion rénale (Imamura, Isaka et al. 2007).

3. Les autres dérivés de l'érythropoïétine

3.1. Asialo-érythropoïétine

La stimulation de l'érythropoïèse nécessite une stimulation continue du R-Epo par l'Epo sur les cellules souches sanguines. Au contraire, un contact bref entre l'Epo et le R-Epo cérébral serait suffisant pour entraîner une neuroprotection *in vitro* (Morishita, Masuda et al. 1997). Ainsi une Epo possédant une demi-vie extrêmement courte pourrait initier les phénomènes de neuroprotection sans stimuler l'érythropoïèse. Le procédé biochimique qui consiste à enlever complètement les acides sialiques de l'Epo permet une dégradation plus rapide de l'Epo *in vivo.* L'Epo ainsi synthétisée s'appelle l'asialo-érythropoïétine (Asialo-Epo) avec une demie-vie de 1,4 minutes, disparaissant du plasma au bout de 1 à 2 heures après son injection intra-veineuse (Erbayraktar, Grasso et al. 2003). L'asialo-Epo apparaît dans le LCR avec un pic de concentration cérébrale obtenu 30 à 60 min après le pic plasmatique. L'injection d'asialo-Epo marquée à l'^{125}I permet la localisation de cette molécule en histologie au niveau des neurones hippocampaux (Erbayraktar, Grasso et al. 2003). Parallèlement aucune stimulation de l'érythropoïèse n'a pu être observée.

L'asialo-Epo à des doses comprises entre 5 et 50 µg/Kg est capable de diminuer le volume cérébral infarci, de diminuer l'apoptose médiée par les caspases 3 et 9 et d'améliorer le neurocomportement dans des modèles

d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne chez le rat (Figure 33) (Erbayraktar, Grasso et al. 2003; Price, Yang et al. 2010).

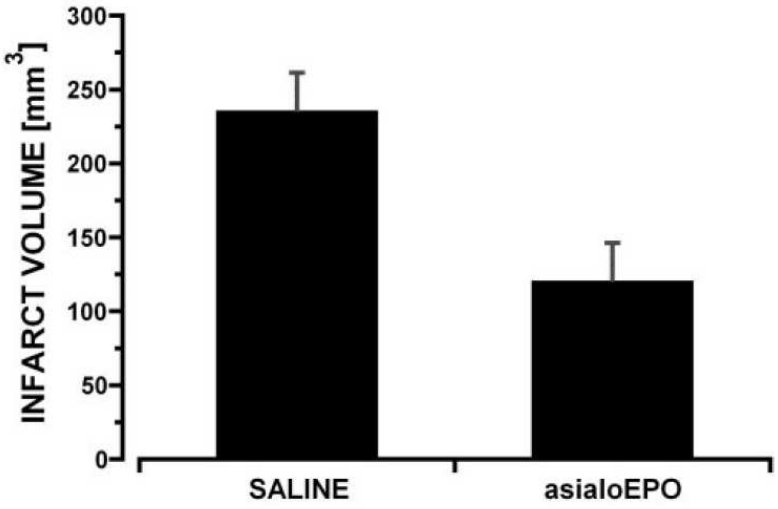


Figure 33 : Diminution du volume de l'infarctus cérébral par un traitement par asialo-Epo d'après Erbayraktar et coll, 2003.

Cette molécule aurait également un effet cardioprotecteur dans des modèles murins d'insuffisance cardiaque (Takeyama, Takemura et al. 2012). Des effets sur l'ischémie-reperfusion rénale (Nakazawa, Isshiki et al. 2010), la compression médullaire traumatique (Erbayraktar, Grasso et al. 2003) et la neuropathie périphérque (Erbayraktar, Grasso et al. 2003) ont été également rapportés.

3.1. Séquence peptidique dérivée de l'érythropoïétine

L'étude de la structure tridimensionnelle de l'Epo révèle que la liaison de l'Epo avec le récepteur de l'érythropoïèse ne met pas en jeu l'hélice B contrairement aux hélices A, C et D (Figure 34). Ainsi les propriétés neuroprotectrices de l'Epo serait médiées par la séquence peptidique de l'hélice B (Brines, Patel et al. 2008).

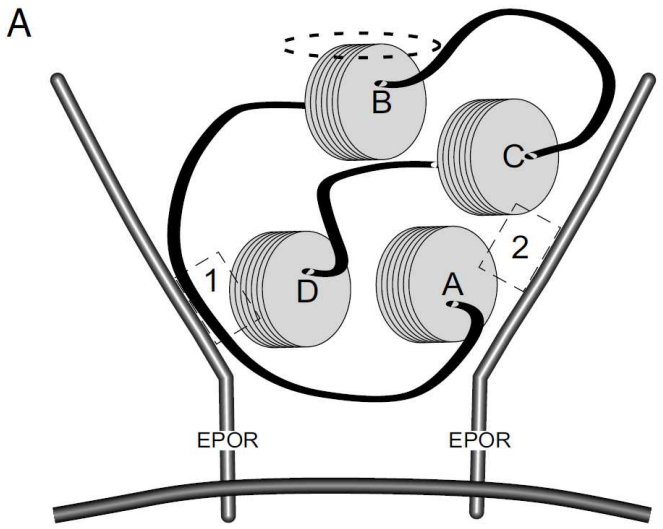


Figure 34: structure tridimensionnelle de l'Epo et interaction avec l'Epo-R classique de l'érythropoïèse d'après Brines et coll, 2008.

La synthèse d'une séquence peptidique mimant l'hélice B de l'Epo, appelée pyroglutamate Hélice B, s'avère ainsi protectrice dans des modèles d'ischémie cérébrale, d'œdème rétinien diabétique et de traumatisme nerveux périphérique (Brines, Patel et al. 2008). Ce peptide montra également des propriétés cytoprotectrices dans modèle de TC avec choc hémorragique (Robertson, Cherian et al. 2011) ainsi que des propriétés cardioprotectrices *in vivo* et *in vitro* (Ueba, Brines et al. 2010).

3.2. Erythopoïétine mutante S100E

L'Epo-S100E est un composé chimique mutant de l'Epo ne possédant pas d'activité hématopoïétique mais gardant une affinité pour le R-Epo cérébral (Leist, Ghezzi et al. 2004). Cette molécule a été testée dans un modèle d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne, permettant une amélioration du score moteur des animaux traités par rapport aux rats témoins (Villa, van Beek et al. 2007).

4. Conclusion

L'érythropoïétine et ses dérivés représentent actuellement un traitement neuroprotecteur prometteur dans de nombreuses pathologies cérébrales dont le TC. De nombreuses preuves expérimentales mais aussi cliniques supportent cette propriété. L'érythropoïétine carbamylée est le dérivé de l'érythropoïétine le plus étudié en expérimental. L'absence d'effets indésirables hématologiques de cette molécule rend son utilisation clinique attractive.

Objectifs du travail

L'œdème cérébral post-traumatique a un rôle majeur dans la constitution des lésions ischémiques secondaires post-traumatiques. Il n'existe pour l'instant aucun traitement étiologique de l'œdème cérébral utilisable en clinique. L'érythropoïétine dans sa forme recombinante s'est avérée anti-oedémateuse dans le modèle expérimental de TC par impact accélération (Verdonck, Lahrech et al. 2007). Cette action anti-oedémateuse impliquerait la modulation de la phosphorylation de certaines protéines kinases dont l'inhibition de la voie Erk (Valable, Francony et al. 2010). Cependant, les doses administrées (5000 UI/kg) rendent son application clinique difficile compte tenu des nombreux effets indésirables attendus. Ainsi la synthèse de dérivés de l'érythropoïétine dénués d'effets hématologiques comme la CEpo constitue un espoir thérapeutique majeur. L'action anti-œdémateuse de la CEpo reste néanmoins méconnue dans le modèle expérimental de TC par impact-accélération.

Le premier objectif de ce travail était l'évaluation de l'effet de la CEpo dans notre modèle expérimental de TC diffus. L'effet anti-œdémateux a été évalué par IRM de diffusion pendant les 6 premières heures post-traumatiques. Les mécanismes cellulaires impliqués ont été évalués par Western-Blot deux heures après le TC. Des tests neurocomportementaux ont été également réalisés jusqu'à 10 jours après le TC. Les effets de la CEpo sur Le pore mitochondrial de transition de perméabilité et sur l'apoptose caspase-3 dépendante ont été également étudiés par mesure de la capacité de rétention calcique des mitochondries cérébrales extraites deux heures après le TC et par mesure immunohistochimique du nombre de cellules apoptotiques exprimant la caspase-3. Enfin une fenètre thérapeutique retardée a été également étudiée par évaluation de l'œdème cérébral par IRM de diffusion après injection de la CEpo deux heures après le TC.

Le TC est par ailleurs responsable d'épisodes d'hypoxie cérébrale, marqueurs indépendants d'un mauvais devenir neurologique chez les patients traumatisés crâniens. L'hypoxie cérébrale est mesurable en clinique au lit du patient par des sondes de $PtiO_2$, par la mesure de la $SvjO_2$ ou par la NIRS. L'IRM, par la mesure du contraste BOLD, permet également de mesurer la saturation en oxygène locale (lSO_2) voxel par voxel au sein du parenchyme cérébral. Cette méthode de mesure demeure néanmoins peu répandue et très hétérogène dans sa méthodologie.

Dans ce contexte, le deuxième objectif de ce travail a été de valider une nouvelle approche IRM de mesure de la lSO_2 cérébrale développée au sein de l'équipe 5 du GIN (travail de thèse de Thomas Christen, 2009) combinant la mesure du contraste BOLD avec la mesure du volume sanguin cérébral (BVf) et de l'appliquer ensuite au modèle expérimental de TC par impact-accélération. Pour cela, nous avons étudié la corrélation des mesures de lSO_2 cérébrale en fonction de différents niveaux de PaO_2 artériel (hyperoxie, normoxie, hypoxie modérée et hypoxie profonde) avec des mesures de la saturation du sinus longitudinal supérieur (SsO_2) chez des rats sains. Après cette phase de validation, cette technique IRM a été appliquée au modèle expérimental de TC par impact-accélération.

La relation entre œdème cérébral et hypoxie cérébrale post-traumatique reste débattue. L'érythropoïétine (Epo) est un agent anti-œdémateux dans notre modèle expérimental de TC par impact-accélération. L'effet de cet agent anti-oedémateux sur l'oxygénation cérébrale post-traumatique reste méconnu cependant. Le troisième objectif de ce travail a donc consisté à évaluer l'effet de l'érythropoïétine sur l'oxygénation cérébrale post-traumatique. Pour cela, nous avons étudié l'effet de l'Epo sur la mesure de la lSO_2 par la méthode IRM validée au sein de l'équipe 5 ainsi que par la mesure de la $PtiO_2$ par fibre optique. Afin de mieux comprendre les déterminants de l'hypoxie cérébrale post-traumatique, la perfusion cérébrale a été également étudiée par méthode de premier passage d'un agent de contraste IRM. L'étude des modifications à l'échelle tissulaire, quant à elle, a été effectuée par microscopie électronique.

Méthodologie générale

1. Animaux

Toutes les expériences ont été réalisées sur des rats Wistar mâles (élevage Janvier, Le Genest Saint-Isle, France) dont le poids était compris entre 350 et 450 grammes sauf pour les tests neurocomportementaux (rats Sprague Dawley adultes mâles). Les animaux étaient gardés dans une animalerie dédiée au GIN dans des cages avec de l'eau et de la boisson *ad libitum* dans un environnement à température contrôlé (20-22°C). Les expériences ont été approuvées par le comité d'éthique du GIN en accord avec les réglementations françaises et la directive du Conseil de la Communauté Européenne du 24 Novembre 1986 sur la protection des animaux utilisés en expérimentation.

2. Modèle de traumatisme crânien par impact-accélération

Le modèle de TC utilisé est celui de l'impact - accélération, responsable d'un œdème cérébral diffus post-traumatique sans fracture, ni contusion hémorragique, initialement décrit par Marmarou et al (Marmarou, Foda et al. 1994). Le rat est anesthésié, ventilé mécaniquement, en décubitus ventral pendant toute la procédure. Après incision du scalp et mise à nue de la table externe par résection du périoste, une pastille de laiton était collée sur le crâne de l'animal. Une masse métallique de 500 g était alors lâchée d'une hauteur de 1,5 mètres à travers un tube en plexiglas et provoquait un impact sur la pastille (figure 35). La tête effectuait alors un mouvement rapide de flexion - extension, à l'origine de lésions axonales diffuses et d'œdème cérébral diffus. La pastille était ensuite retirée et le scalp suturé. L'heure de référence H0 était l'heure du traumatisme chez les rats TC ou un temps équivalent chez les rats sham.

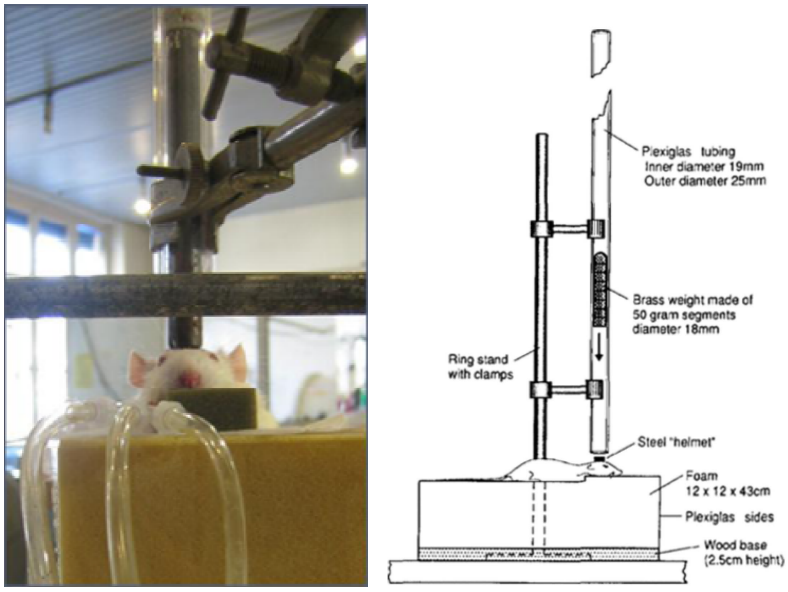


Figure 35: Modèle expérimental de TC par impact-accélération

3. Préparation des animaux et protocoles de traitement

3.1. Préparation des animaux

L'anesthésie générale était induite par inhalation d'isoflurane 5% dans une cage dédiée. Dès la bradypnée, une intubation trachéale était réalisée à l'aide d'un laryngoscope pédiatrique (lame de Miller 0) et d'un cathéter veineux de 14 Gauges. L'animal était ensuite ventilé de manière mécanique et réchauffé par voie externe à l'aide d'une couverture chauffante, afin de maintenir une température entre 36 et 37°C. L'entretien de l'anesthésie générale était réalisé par isoflurane 2 %. Une dissection et une mise à nue des vaisseaux fémoraux étaient ensuite réalisées par incision de la région inguinale. Sous loupe binoculaire une cathétérisation de l'artère et de la veine fémorale étaient réalisées à l'aide de cathéters de 22 Gauges. Le volume minute était réglé en fonction de la $PaCO_2$ obtenue au début d'expérience grâce à une gazométrie artérielle (prélèvement de 100 µl maximum). La $PaCO_2$ cible est comprise entre 30 et 40 mmHg afin de s'affranchir des variations de débit sanguin cérébral liées à la réactivité vasculaire cérébrale au CO_2. Un monitorage par capteur de CO_2 dans l'air expiré était également réalisé

permettant la mesure du CO_2 expiré ($EtCO_2$). La fraction inspirée en O_2 était également adaptée à la PaO_2 mesurée par les gaz du sang.

Pour toutes les procédures nécessitant un réveil de l'animal après la réalisation du traumatisme (test neurocomportementaux et étude de l'apoptose dans l'étude 1), la pose de cathéters fémoraux n'était pas effectuée pour préserver la vitalité de l'animal. Un cathéter de 22G était alors placé sur la queue de l'animal pour effectuer les injections intraveineuses.

3.2. Protocoles de traitement

3.2.1. Injection intraveineuse

L'érythropoïétine utilisée était l'époietine alpha (Eprex®) fournie par Janssen-Cilag Division Ortho Biotech, Issy-les-Moulineaux, France. L'Epo était injectée à la dose de 5000 UI/Kg par voie intraveineuse 30 minutes après le TC (Etude 3).

L'érythropoïétine carbamylée était fournie par le laboratoire Lundbeck A/S, Valby, Denmark. La CEpo était injectée par voie intraveineuse à la dose de 50 µg/Kg, 30 minutes ou deux heures après le TC (Etude 1).

La voie veineuse utilisée était la voie fémorale par les cathéters fémoraux en place ou une injection par la queue de l'animal lorsqu'un réveil de l'animal était nécessaire.

3.2.2. Injection intra-ventriculaire

L'injection intra-ventriculaire d'un inhibiteur de la voie Erk, U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis [2-aminophenylthio] butadiene, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), a été effectuée dans l'étude 1. La mise en place de cette technique a été élaborée par le Dr Marie-Cécile Fèvre (Assistante-Chef de Clinique au Pôle Anesthésie Réanimation du CHU de Grenoble) lors de la réalisation de son Master 2 recherche à l'équipe 5 du GIN (Valable, Francony et al. 2010). Pour cela, le rat était positionné sur une plateforme de stéréotaxie après mise à nu de la boîte crânienne. Un repérage

stéréotaxique par rapport au bregma était alors effectué : 0.8 mm en postérieur, 1.5 mm en latéral et 3.5 mm en profondeur à gauche et 4 mm à droite. L'injection intra-ventriculaire (ventricule latéral droit et gauche) de l'inhibiteur de ERK-1/-2 (U0126 dissout dans une solution de sérum salé contenant 10% de DMSO (diméthylsulfoxyde) à une concentration de 0,5mg/mL) ou du DMSO était réalisée 10 minutes avant le TC (2 µL x 2).

4. Prélèvement sanguin du sinus longitudinal supérieur

La boite crânienne du rat était dénudé sous anesthésie générale dans un cadre stéréotaxique afin de repèrer le point Lambda (Figure 36) en regard duquel le sinus longitudinal supérieur est présent. Une aiguille de 25G est alors introduite à travers la calotte osseuse jusqu'au sinus longitudinal supérieur (retour de sang veineux juste après le franchissement de la boite crânienne). Un prélèvement sanguin veineux pouvait alors être réalisé (environ 100 µl) pour réalisation des gaz du sang.

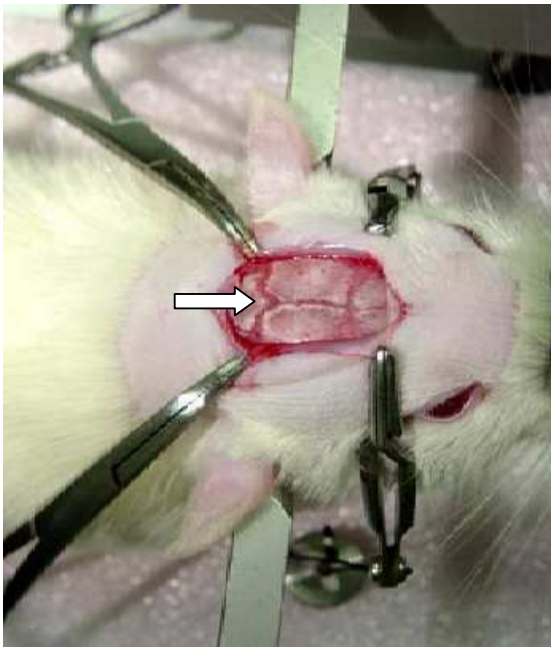


Figure 36 : Point lambda (Flèche blanche)

5. Protocole IRM général

Durant toute la période d'acquisition IRM, les animaux étaient maintenus sous anesthésie générale par isoflurane (Isoflurane expiré à 2%), en ventilation mécanique règlée pour obtenir une $PaCO_2$ comprise entre 30 et 40 mmHg sur les gaz du sang prélevés sur l'artère fémorale. La FiO_2 était également règlée selon la PaO_2 mesurée. La température des rats était monitorée et maintenue par rechauffement externe.

L'acquisition était faite avec un aimant supraconducteur de 4,7 Tesla (Brüker®) avec un diamètre utile de 12cm pour les études 2 et 3. L'étude 1 a été réalisée avec un aimant supraconducteur de 7T. Apres une procédure de shim automatique au deuxième ordre, le protocole IRM comprenait la réalisation d'une carte anatomique pondérée en T_2 en utilisant une séquence d'écho de spin 2D avec les paramètres suivants : temps de répétition (TR)/ temps d'écho (TE) = 4000/33 ms ; un seul moyennage, 13 coupes avec un champs de vision (*Field of view, FOV*) de 30x30 mm² ; matrice= 256 x 256 1, taille du voxel = 17x117x1000 μm^3. L'acquisition durait 2 minutes et 8 secondes. La réalisation de cette carte anatomique permettait la sélection des zones d'intérêts : cortex pariétal et caudoputamen, afin de les reporter sur les autres cartes acquises selon le protocole voulu. L'exploitation des différentes cartes IRM a été efféctuée grâce à un logiciel dévelloppé par l'équipe 5 (uvasc) sous Matlab (Figure 37).

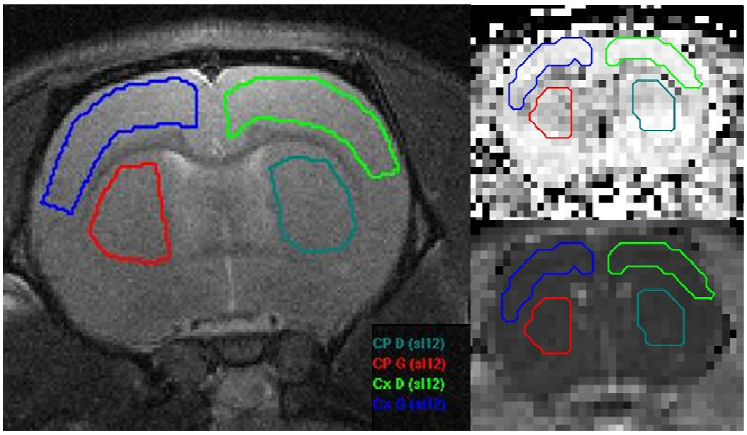


Figure 37 : ROI disposées sur la carte anatomique T_2 (à gauche de l'image) reportée ensuite sur la cartographie de ISO_2 (en haut à droite) et sur la cartographie ADC (en bas à droite).

6. Evaluation de l'œdème cérébral

6.1. Evaluation de l'oedéme cérébral par IRM de diffusion

L'évaluation de l'œdème cérébral par IRM fait appel à l'imagerie de diffusion permettant de mesurer le coefficient apparent de diffusion (ADC) de l'eau voxel par voxel. Lorsqu'un œdème cellulaire est présent, le gonflement cellulaire induit une réduction de la diffusibilité de l'eau et donc une baisse de l'ADC. L'ADC augmente en cas d'œdème vasogénique par augmentation des espaces inter-cellulaires augmentant la diffusion de l'eau entre les cellules.

La séquence utilisée a été une séquence d'écho de spin de Stejskal et Tanner où les gradients de diffusion sont appliqués selon les trois axes principaux X, Y et Z. A partir des images ainsi obtenues, dites « pondérées en diffusion », la valeur de l'ADC selon X, Y et Z dans chaque voxel est calculée grâce à l'équation :

$$S = S_0 \, e^{-bADC}$$

où S représente le signal obtenu après application des gradients de diffusion, S_0 représente le signal en l'absence de gradient de diffusion et b représente le facteur de gradient, une valeur expérimentale qui est dépendante de l'intensité et de la durée des gradients de diffusion ainsi que du temps séparant les deux lobes de gradients appliquées de part et d'autre de l'impulsion de refocalisation 180°.

Dans chaque voxel et pour toutes les acquisitions réalisées aux différents temps, on détermine la valeur du coefficient ADC moyen notée trace de l'ADC, calculée selon :

$$\text{ADC trace (t)} = 1/3\,(\text{ADCx (t)} + \text{ADCy (t)} + \text{ADCz (t)})$$

Les cartographies d'ADC ont été réalisées grâce une séquence d'écho de spin 2D pondérée en diffusion: TR/TE = 2500/30 ms; FOV = 30x30 mm^2; matrice = 64x64; 8 moyennages; taille du voxel 468x468x1000 μm^3. Cette séquence a

été appliquée 4 fois, une fois avec une valeur de b à 0 $s.mm^{-2}$ et 3 fois avec une valeur de b à 800 s.mm-2 dans 3 directions orthogonales, pour cartographier l'ADC. Cette acquisition durait 5 minutes.

6.2. Gravimétrie spécifique

La microgravimétrie permet de déterminer la gravité spécifique (SpGv) d'échantillons de la substance grise cérébrale et de déterminer ainsi le contenu en eau intra cérébral (CEI) grâce à la formule de Takagi reprise par Fatouros (Fatouros, Marmarou et al. 1991):

$$CEI = 462,6 / SpGv – 362,6$$

La gravité spécifique des biopsies cérébrales est déterminée grâce à une colonne gradiente constituée d'un mélange de Kérozène et Bromobenzène réalisant une colonne de densité croissante du haut vers le bas.
La relation entre le niveau d'arrêt des biopsies après 2 minutes et la densité des biopsies est linéaire. L'équation de cette relation linéaire est déterminée en étalonnant la colonne à l'aide de solutions de K_2SO_4 de densités connues (1,045 ; 1,040 ; 1,030 ; 1,025).

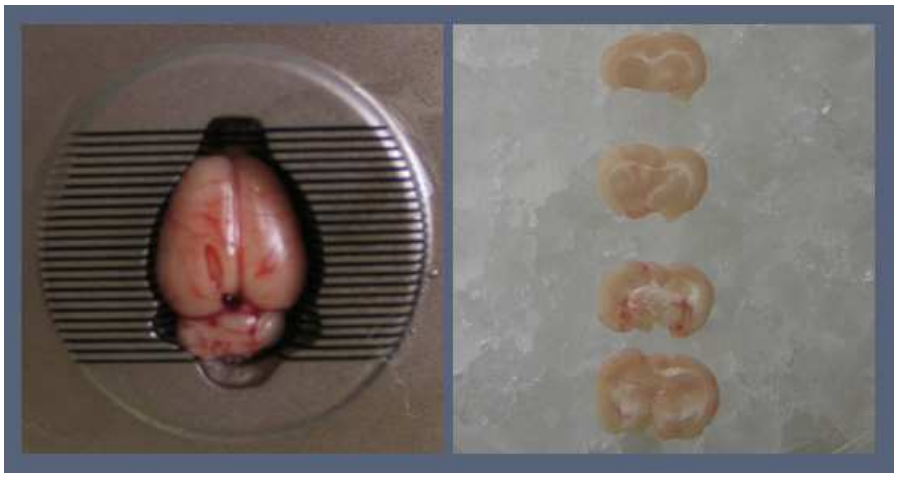


Figure 38: Cerveau de rat et coupes

Chaque colonne a été réalisée une heure avant introduction des biopsies cérébrales, à température constante. Les cerveaux frais ont été coupés en tranche de 2 mm (figure 38), et des biopsies de 2 à 4 mm^3 ont été réalisées au niveau du cortex et du caudoputamen, et déposées au sommet de la colonne de gravimétrie (Figure 39); la hauteur d'équilibre des biopsies a été notée à la deuxième minute après immersion comme décrit par Marmarou et al.

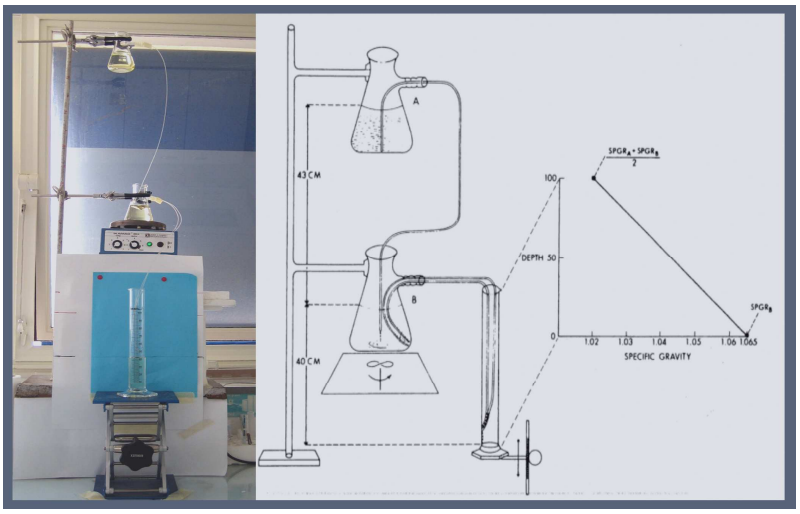


Figure 39: Colonne de gravimétrie

7. Mesure de l'oxygénation cérébrale

7.1. Mesure de la lSO_2 par méthode BOLD

La mesure de la lSO_2 par IRM a été effectuée selon la méthodologie RMN décrite dans la 1ère partie (Chapitre II, paragraphe 3). En résumé, une carte T_2 et une carte de T_2* très haute résolution étaient réalisées ainsi que deux cartes T_2* basse résolution avant et après l'injection d'un produit de contraste paramagnétique (particules d'oxyde de fer, P904, 200 µmol/Kg, Guerbet, France). La réalisation des différentes séquences a permis la réalisation de cartographies T_2, T_2* et de VSC afin de déterminer la lSO_2.

La carte T_2 était obtenue en utilisant une séquence multi echo de spin 2D : TR/TE = 1500/15 ms ; 20 echos de spin, ΔTE = 12 ms ; un seul

moyennage ; matrice= 64 x 64 et taille du voxel = 468 x 468 x 1000 μm^3. Temps d'acquisition de 1 min 36 s.

La carte T2* haute résolution était obtenue avec une séquence multi-écho de gradient 3D (FOV = 30x30x6 mm^2; matrice = 96x128x30; taille du voxel= 234x234x200 μm^3). Temps d'acquisition de 4 min 48s.

La carte T_2* était effectuée avant et après l'injection intraveineuse d'un agent de contraste paramagnétique (P904, Guerbet, France): TR/TE = 6000/4 ms; 15 echos de gradient; ΔTE = 4 ms; un seul moyennage; FOV = 30x30 mm^2; matrice = 64x64; taille du voxel= 468x468x1000 μm^3, temps d'acquisition de 38s.

7.2. Mesure de la $PtiO_2$

Une sonde de $PtiO_2$ (Oxylite, Oxford Optronics, Oxford, Royaume-Uni) était insérée de manière stéréotaxique à travers une aiguille de 25G (-1 mm à partir du bregma, 3 mm à partir de la suture sagittale et 3 mm de profondeur à partir de la surface de la boite crânienne pour le cortex, 6 mm pour le caudoputamen) après la réalisation du TC ou son équivalent (Figure 40). Après une heure de stabilisation, la FiO_2 était transitoirement augmentée pour vérifier la fonctionnalité de la $PtiO_2$ ($PtiO_2$ à 60 mmHg +/- 10 mmHg sous 100% de FiO_2).

Figure 40: Mesure de la PtiO2 par méthode stéréotaxique

8. Mesure du débit sanguin cérébral par IRM

Le débit sanguin cérébral a été mesuré par l'intermédiaire du calcul du temps de transit moyen d'un agent de contraste paramagnétique (100 µml de P904) par méthode de 1er passage. Pour cela une sequence dynamique d'écho de gradient echo-planar-imaging (EPI) était acquise: TR/TE = 250/12 ms; 2 segments; 1 moyennage; FOV = 30x30 mm^2; matrice = 64x64; taille du voxel = 468x468x1000 µm^3. L'acquisition d'une image durait 0,5 sec et la sequence EPI était répétée 120 fois (durée totale 1 min). Le produit de contraste (P904 à 100µmol/kg, Guerbet, France) était injecté après avoir acquis 20 images. Une seconde dose de P904 (100µmol/kg) était injectée ensuite pour obtenir un animal chargé à 200µmol/kg. Le volume sanguin cérébral, nécessaire à la mesure de la lSO_2, était obtenu par la combinaison des cartes T_2* avant et après l'injection de de 200µmol de particules de fer superparamagnétiques.

9. Microscopie électronique

L'analyse par microscopie électronique a été réalisée grâce à une collaboration avec le Dr Karin Pernet-Gallay de de la plateforme de microscopie électronique selon le protocole suivant. Après extraction du cerveau, 4 échantillons de cortex de chaque rat ont été fixés dans du glutaraldehyde 2,5 % mélangé à du cacodylate buffer 0,1 M à pH 7,4 pendant 24 h à température ambiante. Après 3 lavages au cacodylate buffer 0,1 M, les échantillons sont post-fixés avec du tétroxyde d'osmium à 1% mélangé à du cacodylate 0,1 M à pH 7,2 pendant 1 heure à 4℃. Après un lavage étend u à l'eau, les cellules sont colorées avec une solution d'acétate d'uranyle à 1% pH 4 et d'eau pendant 1h à 4℃. Les échantillons ont ensuite été déshydratés dans de l'alcool à différentes titrations (30 %-60%-90%-100%-100%-100%) puis infiltrés avec un mélange à 1 pour 1 d'epon/alcohol 100% pendant 1h puis plusieurs bains d'epon (Flukka) pendant 3 heures. Les échantillons ont ensuite été inclus dans des capsules de résine puis laissés à polymériser durant 72h à 60℃. Des coupes ultrafines de ces échantillons ont été réalisées grâce à un ultra microtome (Leica). Elles ont été colorées avec de l'acétate d'uranyle à 5% et du

citrate à 0,4 % avant d'être observées sous microscope électronique à 89 kV (JEOL 1200EX). Les images ont été acquises avec une caméra digitale (Veleta, SIS, Olympus) et une analyse morphométrique a été réalisée avec le logiciel iTEM (Olympus).

10. Evaluations biochimiques

ERK-1/-2 total, la phosphorylation de ERK-1/-2 ont été analysés à h+1 et à h+2 après sacrifice de l'animal dans l'étude 1. Le cerveau, extrait et congelé rapidement dans une solution d'isopentane avant stockage à -80℃, a été adressé l'équipe CERVOXy de l'UMR 6232 CI-NAPS de Caen pour realisation des Western Blot (collaboration avec le Dr Myriam Bernaudin et le Dr Samuel Valable). Les analyses Western Blot ont été réalisées après homogénéisation des échantillons de cerveaux dans une solution lytique contenant du Tris (50 mM), du NaCl (150 mM), 0,5% de Triton X-100, de l'EDTA (1mM) (Sigma-Aldrich) et après supplémentation par un mélange associant des inhibiteurs de phosphatases et de protéases (Sigma-Aldrich). Les concentrations en protéines des extraits de cerveaux ont été déterminées par une méthode colorimétrique. 20µg de protéine par échantillon ont été séparés sur un gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) et les protéines transférées sur une membrane de PVDF. Celles-ci ont été bloquées pendant 1h avec du TTBS-Régilait (10mM de TRIS, 200mM de NaCl et 0,05% de tween) puis incubées pendant une nuit à 4℃ avec les anticorps anti Phospho-ERK-1/-2 (Santa Cruz) et anti-total ERK-1/-2 (Santa Cruz). Les membranes ont été incubées pendant une heure à température ambiante avec des anticorps liés à la peroxidase. Après lavage, les bandes immunoréactives sont révélées par chemiluminescence.

11. Evaluations immunohistologiques

11.1. Immunomarquage de l'expression des caspases-3

Le parenchyme cérébral était découpé à -20℃ par un cryotome en tranches de 8 µm. Les coupes étaient ensuite fixées sur des lames pré

encollées à raison de 4 coupes par lames. Pour chaque animal 10 lames étaient réalisées espacées d'environ 150 µm au niveau des ventricules latéraux et des noyaux gris centraux. Les lames étaient ensuite congelées à -20 °C.

Pour chaque animal, 2 lames soit 8 coupes du parenchyme cérébral étaient ensuite fixée par du paraformaldéhyde 4%. Les lames étaient ensuite rincées au tampon phosphate salin (PBS) durant 10 mn 3 fois de suite. Les coupes étaient ensuite perméabilisée à l'aide d'un soluté à base de PBS, d'un détergent (triton X-100 0,3%) et de sérum de chèvre 5% durant 30 mn. les lames au PBS étaient rincées de nouveau selon la méthode décrite ci-dessus.

L'anticorps primaire (Cleaved Caspase 3 Rabbit, Cell Signaling Techno©) était ensuite dilué dans un mélange de PBS, de triton X-100 0,1 %, de tween 0,1% et de sérum de chèvre 1% à une densité de 1600 et laissé à incuber sur les lames durant 14 heures à 4 °C. Les lames étaien t ensuite rincées au PBS. L'anticorps secondaire couplé à une cyanine (Cy3 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit, Jackson©) était ensuite dilué dans un mélange de PBS, de triton X-100 0,1 %, de tween 0,1% et de sérum de chèvre 1% à une densité de 1000 et laissé à incuber sur les lames durant 1 heure à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les lames ont été de nouveau rincées au PBS. Une lamelle était ensuite montée sur la lame à l'aide d'un milieu de montage (Roti Mount FluorCare DAPI, Roth©) contenant du DAPI et conservée à 4 °C.

11.2. Quantification de l'expression des caspases-3

Les lames étaient ensuite examinées au microscope à fluorescence à un grossissement de 20 fois et photographiées par un logiciel. Pour chaque champ microscopique était réalisé une photographie des noyaux sous un faisceau ultra violet de longueur d'onde 358 nm avec un temps d'exposition de 200 à 500 ms et une photographie des noyaux exprimant la caspase 3 sous un faisceau ultra violet de longueur d'onde 550 nm avec un temps d'exposition de 10 à 15 secondes. Les mesures étaient effectuées pour chaque coupe sur le cortex droit et sur le cortex gauche. L'analyse des photographies a été réalisée par le logiciel image J (marque). Pour chaque photographie, l'image était reformatée en 8 bits puis le seuil était ajusté afin de permettre l'analyse automatisée de la

photographie et le comptage des particules de plus de 100 pixels visualisées. Pour chaque champ microscopique, le pourcentage de cellules en apoptose était mesuré en rapportant le nombre de noyaux exprimant la caspase 3 au nombre total de noyau visualisé grâce au DAPI. Ainsi pour chaque cerveau 16 mesures du pourcentage de cellules exprimant la caspase 3 étaient réalisées (Figure 41).

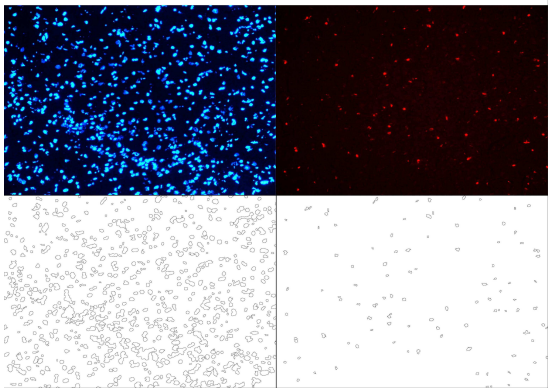


Figure 41 : Photographies (en haut) montrant les noyaux des cellules en bleu et les noyaux exprimant la caspase-3 en rouge. Analyse automatisée (en bas) grâce au logiciel imageJ.

11.3. Immunomarquage au pimonidazole

Le pimonidazole est un composé nitroimidazole qui se distribue dans tous les tissus, y compris le cerveau. Il est réduit par les cellules hypoxiques viables dont la pression partielle PO_2 est inférieure à 10 mmHg à 37℃. Il forme ainsi des liaisons covalentes avec certaines protéines cellulaires. Ces liaisons, une fois formées, vont empêcher le pimonidazole de ressortir de la cellule. Les zones en hypoxie sont ensuite détectées à l'aide d'un marquage immunohistochimique dirigé contre le pimonidazole. Pour ce marquage histologique des zones hypoxiques, les coupes de cerveau ont été fixées à l'aide de PFA 4% puis incubées avec l'anticorps antipimonidazole (hypoxyprobe-1, Chemicon) au 1/10 dans du PBS-BSA (3%). Elles ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire : anti-souris biotinylé (B7151, Sigma) dilué au 1/200ème, puis avec une extravidine peroxidase au 1/500. Le signal a été révélé par de la diaminobenzidine (DAB) en présence d'H_2O_2 à 1%. Le montage des lames a été fait avec du Pertex.

12. Mitochondries

12.1. Extraction des mitochondries

Dans l'étude 1, Le parenchyme cérébral était récupéré par craniectomie et dissection puis était plongé dans un tampon MSHE à 4℃ composé d'eau très pure (Calcium < 0,0002 ppm), de D-Mannitol 225 mM (Marque), de Sucrose 75 mM, d'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) 10 mM et d'EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid) 1 mM ramené au pH 7,4. Les méninges étaient retirées à la pince puis le parenchyme était plongé dans du tampon MSHE additionné d'albumine bovine à 1 mg/mL (MSHE-BSA). Il était ensuite broyé avant d'être soumis à une technique de fractionnement des composés cellulaires par centrifugation différentielle réfrigérée comprenant une mise en présence de 20 µL de digitonine 20% afin d'augmenter le rendement de l'extraction mitochondriale par solubilisation des membranes cellulaires. Le culot mitochondrial était ensuite resuspendu dans du MSHE-BSA.

12.2. Quantification de la concentration en mitochondrie

La quantification de la concentration de mitochondries était réalisée en dosant les protéines du culot mitochondrial selon la méthode de Bradford. Une gamme étalon était réalisée à l'aide d'albumine de sérum bovin échelonnée avec des concentrations de 1 mg/mL, 0,75 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL et 0 mg/mL. Le culot mitochondrial et le tampon MSHE – BSA étaient dilués au 50ème. 5 µL de chaque solution étaient placés en triplicat dans les puits de la microplaque puis 250 µL de réactif de Bradford étaient rajoutés dans chaque micro puits. La plaque était ensuite lue en utilisant un spectrophotomètre. Après mesure de l'absorbance de la solution de mitochondrie et soustraction de l'absorption de la solution de MSHE-BSA, la concentration en protéine mitochondriale était déduite en utilisant la pente de la droite de la gamme étalon.

12.3. Mesure de la Capacité de Rétention Calcique

La capacité de rétention calcique (CRC) qui représente la quantité de calcium nécessaire pour provoquer l'ouverture du mPTP est devenue le critère classique pour évaluer la vulnérabilité des mitochondries dans les modèles expérimentaux La réaction était effectué dans un tampon contenant de l'eau très pure, du sucrose à 250 mM, du phosphore inorganique à 1 mM, du TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethane) à 10 mM et du MOPS (3-(N-morpholino) propanesulfonic acid) à 10 mM à 30 ℃ et à pH 7,4. La concentration calcique extra-mitochondriale étant suivie grâce à une sonde fluorescente (Calcium Green, Invitrogen®) à 0,25 mM à l'aide d'un fluorimètre en présence d'une concentration de 0,5 mg/ml de mitochondries. Des additions successives de calcium (10 µM) toutes les 60 secondes ont été utilisées pour mesurer et quantifier la capacité de rétention calcique du mPTP (figure 42), selon 4 conditions expérimentales :

- En présence de succinate 5 mM (substrat du complexe II).
- En présence de succinate 5 mM et de ciclosporine A (CSA) 1µM, inhibiteur de la formation du mPTP.
- En présence de glutamate/malate (G/M, 5 mM) substrats du complexe I.
- En présence de G/M 5 mM et de CSA 1 µM.

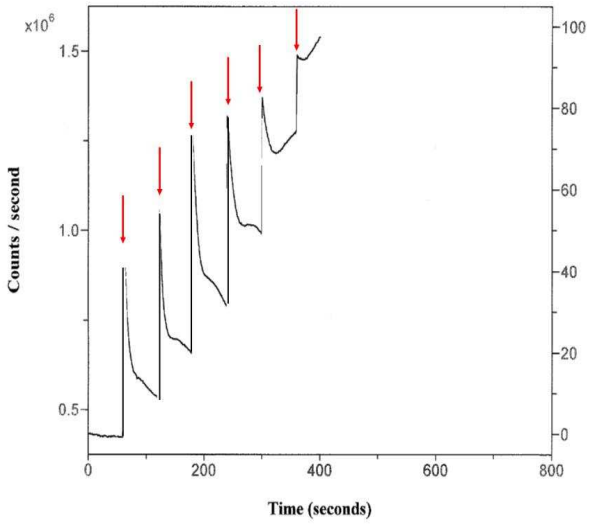


Figure 42 : Exemple de mesure de la CRC (rat Sham-Placebo) en présence de succinate : Les flèches rouges représentent les ajouts de calcium

13. Tests neurocomportementaux

Les données immédiatement collectées après l'arrêt de l'anesthésie ont été :

1) La durée de l'anesthésie générale.
2) La mortalité immédiate recueillie dans les 6 heures après l'extubation.
3) Le délai mesuré en secondes de récupération de tests réflexes sensorimoteurs : réflexe cornéen (à l'aide d'un coton tige effilé), test de rétraction de la patte arrière et de la queue (pince à griffe), le support de tête et le test de retournement lorsque l'animal est placé sur le dos.
4) Le délai d'extubation a été également mesuré.

Après leur retour à l'animalerie, les rats étaient maintenus dans un cycle jour-nuit de 12 heures avec un taux d'humidité et une température contrôlés à des valeurs normales. Les boissons et l'alimentation étaient fournies *ad libitum*.

Au 3ème jour post-traumatique, les tests neurocomportementaux ont été réalisés chez les rats survivants :

1) Le test d'ablation d'adhésif sur la patte a été réalisé de J3 à J10 post-traumatisme après un entrainement de 3 jours. Après 60 secondes d'habituation dans une boîte en plexiglas, deux adhésifs de 1 cm^2 étaient collés sur les coussinets des pattes avant. Le délai de retrait de 1 des 2 adhésifs était mesuré à 3 reprises avec un intervalle de 5 minutes pendant une durée maximum de 300 secondes.

2) Le test d'évitement actif était réalisé de J6 à J10 apès le traumatisme afin d'explorer les lésions du cortex retroslénial, responsable des comportements moteurs stéréotypés. Pour cela, une boite spécifique (rat shuttle box LE 916, Panlab, S.L. Barcelone, Espagne) était placé dans un environnement calme. Cette boite est divisée en 2 compartiments identiques (25cmx25cmx27cm) communicants par une porte de 8cm sur 8cm. Le plancher est constitué d'une grille de fer connectée à un générateur électrique. Le rat est placé dans un compartiment dans lequel aucun stimulus n'est effectué pendant 5 minutes. Après cette période, une série de 10 tests à 30 secondes d'intervalle est réalisée. Un stimulus combinant une lumière (10 W) et un son (500Hz, 60 dB)

était appliqué pendant 5 secondes suivi d'un choc électrique (0,5 mA) sur les pattes du rat par l'intermédiaire de la grille électrifiée pendant 5 secondes. Une réponse correcte constitue un changement de compartiment pendant les 5 premières secondes (avant le choc électrique).

14. Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel Statview 5.0 (StatView SE program, SAS Institute, Cary, NC). Les données sont exprimées en moyenne ± écart standard à la moyenne. Une valeur de $p<0,05$ a été considérée comme significative.

Les tests statistiques utilisés sont les suivants :

Comparaison de 2 groupes : Test de Mann-Withney (variable continue) ou test du Chi-2 (variable discontinue).
Comparaison de 3 groupes et plus : test de Kruskall Wallis suivi d'un test de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni pour comparaisons multiples.
Comparaison de mesures répétées : ANOVA pour mesure répétée. L'analyse intra-groupe a été réalisée avec une analyse *post hoc* par test F de Scheffé avec H0 comme temps de référence. Les différences inter-groupes ont été analysées en utilisant un test de Kruskall Wallis pour les variables continues et test du Chi-2 pour les variables discontinues.
Les différentes corrélations ont été réalisées avec un test de corrélation de Pearson.

Résultats

L'ensemble des travaux présentés ici est le fruit d'un travail d'équipe, réalisé au sein de l'équipe 5 du GIN et avec l'aide de différents collaborateurs que je mentionne ici. Toutes les acquisitions IRM ont été réalisées sur la plateforme IRM de Grenoble (UMS IRMaGe).

L'étude 1 a été publiée dans *Critical Care Medicine* :

P. Bouzat, G. Francony, S. Thomas, S. Valable, F. Mauconduit, M.C. Fèvre, E.L. Barbier, M. Bernaudin, H. Lahrech, J.F. Payen. Reduced brain edema and functional deficits after treatment of diffuse traumatic brain injury by carbamylated erythropoietin derivative. Crit Care Med. 2011; 39 : 2099-105.

Mon implication dans ce travail a consisté à la réalisation des manipulations IRM avec l'aide du Dr Sébastien Thomas lors d'un stage M2R en 2009-2010 (Assistant-Chef de Clinique au Pôle Anesthésie Réanimation) et à la réalisation de la gravimétrie spécifique. J'ai aussi participé aux tests neurocomportementaux. La réalisation des Western Blot revient à l'équipe CERVOXy de l'UMR 6232 CI-NAPS de Caen (Dr Samuel Valable). Les tests neurocomportementaux ont été mis au point par le Dr Gilles Francony (responsable de la réanimation neurochirurgicale du CHU de Grenoble).

D'autres résultats complémentaires non publiés relatifs à la CEpo sont également présentés. *Le travail relatif à l'étude du métabolisme mitochondrial a été réalisé par le Dr Thibault Trouve-Buisson (étudiant M2R 2011-2012) avec mon encadrement et avec la collaboration du Dr Cécile Batandier de l'équipe du Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliqué de Grenoble. L'administration retardée de la CEpo a été réalisée par le Dr Lucie Gaide-Chevronnay (étudiante M2R 2010-2011) avec mon encadrement.*

L'étude 2 fait partie d'un large projet de publication de l'équipe 5 en cours d'écriture, comprenant les applications de la mesure IRM de la ISO_2 à d'autres modèles expérimentaux comme l'ischémie cérébrale ou les tumeurs cérébrales. Seuls les résultats en lien direct avec ce travail sont présentés.

T. Christen*, P. Bouzat*, N. Pannetier, N. coquery, A. Moisan, B. Lemasson, S. Thomas, E. Grillon, O. Detante, C. Rémy, J.-F. Payen, E.L Barbier. In Vivo Mapping of Brain Tissue Oxygen Saturation using Magnetic Resonance Imaging. En cours d'écriture.
* co-premiers auteurs

Mon implication personnelle dans ce travail a consisté à la réalisation complète de ces manipulations : préparation des animaux, réalisation de l'IRM, prélèvements au niveau du sinus longitudinal supérieur et reconstruction des cartographies IRM sous Matlab. Une participation aux résultats obtenus dans l'ischémie cérébrale (travail de thèse du Dr Anaick Moisan, équipe 5 du GIN) a été également effectuée.

L'étude 3 constitue un article accepté dans *Critical Care Medicine* :

P. Bouzat, A. Millet, Y. Boué, K. Pernet-Gallay, T Trouve-Buisson, L. Gaide-Chevronnay, E.L. Barbier, J.F. Payen. Changes in brain tissue oxygenation after treatment of diffuse traumatic brain injury by erythropoietin. Crit Care Med. 2012. In press.

Mon implication dans ce travail a consisté à la réalisation des manipulations IRM et des manipulations $PtiO_2$ avec l'aide du Dr Anne Millet (étudiante M2R 2010-2011) et du Dr Yvonnick Boué (étudiant M2R 2011-2012). La microscopie électronique a été réalisée en collaboration avec le Dr Karin Pernet-Gallay de la plateforme de microscopie électronique du GIN.

.

Etude 1

Effet de l'érythopoïétine carbamylée dans un modèle de traumatisme crânien diffus

Dans une première étude, nous avons testé l'érythropoïétine carbamylée (CEpo) à la dose de 50 µg/Kg injectée par voie intraveineuse 30 minutes après la réalisation d'un TC de type impact-accélération afin d'évaluer son effet sur l'œdème cérébral ainsi que son interaction avec la voie de signalisation intra-cellulaire Erk. Le neurocomportement des animaux traités a été également étudié. Pour cela, l'œdème cérébral a été mesuré par IRM de diffusion avec mesure du coefficient apparent de diffusion de l'eau de H3 à H6 et par gravimétrie spécifique 6 heures après le TC. La phosphorylation d'Erk a été estimée par Western Blot ; le lien de causalité entre la voie Erk et l'œdème cérébral a été établi en mesurant l'œdème cérébral après l'injection intra-ventriculaire d'un inhibiteur de la voie Erk. Le neurocomportement des animaux a été établi jusqu'à 10 jours après le TC en utilisant des tests cognitifs et moteurs : le test d'ablation d'un papier adhésif sur la patte et le test d'évitement actif. L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'une publication dans *Critical Care Medecine.*

Ensuite, nous avons étudié l'effet de la CEpo sur le pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP) et l'apoptose cérébrale post-traumatique. Après sacrifice des animaux, les mitochondries cérébrales ont été extraites afin de tester la résistance à l'ouverture du mPTP par calcul de la capacité de rétention calcique *in vitro*. L'apoptose caspase-3 médiée a également été étudiée 24 heures après le TC par immunohistochimie.

Enfin nous avons voulu tester une fenêtre thérapeutique retardée (2 heures après le TC) afin de déterminer si l'administration de CEpo tardive possédait toujours une action anti-oedémateuse. Nous avons donc effectué un suivi de l'œdème cérébral par IRM de diffusion de H1 à H6 avec une injection de CEpo à la dose de 50 µg/Kg deux heures après le traumatisme.

Reduced brain edema and functional deficits after treatment of diffuse traumatic brain injury by carbamylated erythropoietin derivative

Pierre Bouzat, MD; Gilles Francony, MD; Sébastien Thomas, MD; Samuel Valable, PhD; Franck Mauconduit, BSc; Marie-Cécile Fevre, MD; Emmanuel L. Barbier, PhD; Myriam Bernaudin, PhD; Hana Lahrech, PhD; Jean-Francois Payen, MD, PhD

Objective: **To investigate the effects of carbamylated erythropoietin, a modified erythropoietin lacking erythropoietic activity, on brain edema and functional recovery in a model of diffuse traumatic brain injury.**

Design: **Adult male Wistar rats.**

Setting: **Neurosciences and physiology laboratories.**

Interventions: **Thirty minutes after diffuse traumatic brain injury (impact-acceleration model), rats were intravenously administered with either a saline solution (traumatic brain injury-saline) or carbamylated erythropoietin (50 μg/kg; traumatic brain injury-carbamylated erythropoietin). A third group received no traumatic brain injury insult (sham-operated).**

Measurements and Main Results: **Three series of experiments were conducted to investigate: 1) the effect of carbamylated erythropoietin on brain edema before and 1 hr after traumatic brain injury using diffusion-weighted magnetic resonance imaging and measurements of apparent diffusion coefficient (n = 10 rats per group), and the phosphorylation level of brain extracellular-regulated kinase-1/-2 was also determined to indicate the presence of an activated cell signaling pathway; 2) the time course of brain edema using magnetic resonance imaging between 4 and 6 hrs postinjury and the gravimetric technique at 6 hrs (n = 10 rats per group); and 3) motor and cognitive function over 10 days post traumatic brain injury, testing acute somatomotor reflexes, adhesive paper removal, and two-way active avoidance (n = 8 rats per group). Compared to traumatic brain injury-saline rats, rats receiving traumatic brain injury-carbamylated erythropoietin showed a significant reduction in brain edema formation at 1 hr that was sustained until 6 hrs when results were comparable with sham-operated rats. This antiedematous effect of carbamylated erythropoietin was possibly mediated through an early inhibition of extracellular-regulated kinase-1/-2 phosphorylation. Compared to traumatic brain injury-saline rats, traumatic brain injury-carbamylated erythropoietin rats showed improved functional recovery of the acute somatic reflexes post traumatic brain injury, took less time to remove adhesive from the forelimbs, and showed higher percentages of correct avoidance responses.**

Conclusion: **Our findings indicate that early posttraumatic administration of carbamylated erythropoietin reduces brain edema development until at least 6 hrs postinjury and improves neurologic recovery. Carbamylated erythropoietin can thus be considered as a potential agent in the treatment of traumatic brain injury-induced diffuse edema. (Crit Care Med 2011; 39:000–000)**

Key Words: brain edema; carbamylated erythropoietin; erythropoietin; magnetic resonance diffusion-weighted imaging; magnetic resonance imaging; neurological outcome; traumatic brain injury

A large body of evidence has shown that recombinant human erythropoietin (rhEPO) possesses neuroprotective properties in several *in vitro* and *in vivo* models of central nervous system injuries (1–3). However, these neuroprotective benefits were obtained using large and/or multiple doses of rhEPO, triggering unwanted overstimulation of the bone marrow and inducing a prothrombotic state, as shown in stroke patients (4). To address this issue, various strategies have been developed to dissociate tissue-protective and erythropoietic activities using nonerythropoietic EPO derivatives (5).

In a model of focal brain ischemia, carbamylated EPO (CEPO) initially showed equivalent tissue-protective properties as those reported for rhEPO, with no effect on the hematocrit or binding to the classic EPO receptor (EPOR) (6, 7). This prompted studies demonstrating the beneficial effects associated with CEPO

From the INSERM (PB, GF, ST, FM, MCF, ELB, HL, JFP), U836, Grenoble, F-38042, France; Grenoble Institut des Neurosciences (PB, GF, ST, FM, MCF, ELB, HL, JFP), Université Joseph Fourier, Grenoble, F-38042, France; Département d'Anesthésie-Réanimation (PB, GF, ST, MCF, JFP), Hôpital Michallon, Grenoble, F-38043 France; and Equipe CERVOxy (SV, MB), CI-NAPS, UMR 6232, Université de Caen Basse-Normandie, Université Paris-Descartes, CNRS, CEA, Caen, France.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.ccmjournal.com).

Drs. Bouzat and Francony contributed equally to this work.

Supported, in part, by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Institut pour la Recherche sur la Moelle Epinière et l'Encéphale (IRME), Association Française contre les Myopathies (AFM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and Ministère de l'Education, de la Recherche et de la Technologie, France.

The authors have not disclosed any potential conflicts of interest.

For information regarding this article, E-mail: jfpayen@ujf-grenoble.fr

Copyright © 2011 by the Society of Critical Care Medicine and Lippincott Williams & Wilkins

DOI: 10.1097/CCM.0b013e31821cb7b2

use in models of brain ischemia and spinal cord injury (8–11). Surprisingly, studies on the effects of CEPO after traumatic brain injury (TBI) have been sparse. In a model of focal TBI, rats treated with CEPO showed enhanced spatial learning accompanied by a proliferation of new cells within the dentate gyrus (12), while CEPO addition reduced posttraumatic cell injury in organotypic hippocampal slices (13). In these studies, CEPO and EPO exerted similar neuroprotective effects. Rats treated with CEPO following focal TBI exhibited a reduction in cortical and hippocampal lesions together with enhanced angiogenesis and neurogenesis (14).

In clinical practice, TBI induces the activation of a biochemical cascade, potentially leading to the dangerous occurrence of brain edema, considered to be a major cause of neurologic deterioration through the elevation of intracranial pressure and a concomitant impairment of brain perfusion (15). Despite the testing of numerous compounds in experimental TBI models, no pharmacologic agent has been proven to specifically block the development of diffuse brain edema in the clinical setting (16, 17). In a previous rodent model of diffuse TBI, we found that rhEPO blocked the development of posttraumatic brain edema as early as 1 hr after trauma, the effect of which was sustained for up to 6 hrs after treatment (18). We subsequently identified that this rhEPO-induced reduction of brain edema specifically acts by reducing phosphorylation of brain extracellular-regulated kinase (ERK)-1/-2 (19). Activation of this mitogen-activated protein kinase modulates the activity of several transcriptional factors that in turn aggravate cell damage, brain edema, and outcome following TBI (20, 21). Based on the similar neuroprotective effects displayed by rhEPO and CEPO, we hypothesized in this study that CEPO might demonstrate antiedematous properties within the same model of diffuse TBI, and postulated that this action might occur as early as 1 hr after trauma. We also explored the long-term effects of CEPO on post-TBI functional recovery over the 10 days following injury.

MATERIALS AND METHODS

Adult male Wistar rats (350–450 g) were studied in three series of experiments. Each group included ten rats unless otherwise specified. In the first series of experiments, we investigated the early effects of CEPO on posttraumatic brain edema using diffusion-weighted magnetic resonance imaging (MRI) both before (control) and 1 hr (H1) after TBI. At H1, the effect of CEPO on ERK-1/-2 phosphorylation (activation) levels was assessed on brain extracts. Three groups of TBI rats were studied: a TBI-saline group receiving saline treatment, a TBI-CEPO group receiving CEPO 30 min following the TBI insult, and a TBI-saline group receiving intracerebroventricular administration of ERK-1/-2 inhibitor before injury. The former two groups were pretreated with an intracerebroventricular administration of vehicle before TBI.

In the second series of experiments, we used MRI to study brain edema over a longer time course between 4 hrs (H4) and 6 hrs (H6) postinjury, and also a gravimetric technique to measure brain water content (BWC) at H6 after TBI.

In the third series of experiments, motor and cognitive tests were performed over the 10-day period following injury (eight rats per group). The latter two series of experiments comprised three groups of rats: TBI-saline, TBI-CEPO, and sham-operated for which the same surgical preparation was administered but no insult was received before the addition of saline or CEPO.

Experimental Protocol

The study design was approved by the local Internal Evaluation Committee for Animal Welfare and Rights. Experiments were performed in accordance with guidelines stipulated by the French Government (licenses 380819 and A3851610008). Anesthesia was induced and maintained with isoflurane (inhaled fraction of 2%) throughout the study period. After tracheostomy or tracheal intubation, rats were mechanically ventilated with 60% air–40% oxygen using a rodent ventilator (SAR-830/P, CWE, Ardmore, PA) as long as required by the experiments. Maintenance of rectal temperature at 36.5 ± 0.5°C was ensured (see Section 1 of Supplemental Digital Content 1, http://links.lww.com/CCM/A253).

Injury was induced by dropping a 500-g mass through a vertical cylinder from a height of 1.5 m onto a metallic disc glued to the skull, according to the impact-acceleration model (22) (see Section 2 of Supplemental Digital Content 1, http://links.lww.com/CCM/A253). The reference time (H0) corresponded to the moment of impact (TBI-CEPO and TBI-saline) or to an equivalent time (sham-operated). At 30 mins after H0, rats were intravenously administered either 1 mL of an isotonic saline solution (TBI-saline) or 50 μg/kg of CEPO (H Lundbeck A/S, Valby, Denmark) diluted in 1 mL of saline solution (TBI-CEPO). This CEPO dose was selected based on its equivalence to the 5000 UI/kg (40 μg/kg) of EPO reported to produce neuroprotective effects (6).

MRI Measurements

MRI was performed at 7T in a horizontal bore magnet (Bruker Biospec 47/40 USR AV III, Bruker BioSpin, Wissembourg, France) equipped with actively shielded gradient coils generating gradients of up to 600 mT/m. Diffusion-weighted images were acquired using a T_2-weighted spin-echo sequence. Parameters of the diffusion sensitization were: duration (δ) = 5 msec, separation (Δ) = 15 msec, b~0 (reference) or b = 500 sec/mm^2. Seven adjacent rostrocaudal slices (1-mm thickness) were acquired between −5 mm and +1 mm relative to the bregma, using ultrafast echo planar imaging (repetition time = 2000 msec; echo time = 35 msec; field of view = 30 × 30 mm^2; acquisition matrix = 90 × 90; 2 averages). Acquisition of the set of diffusion-weighted images lasted about 20 mins. In the first series of experiments, rats were repositioned after the insult to estimate the changes in the apparent diffusion coefficient (ADC) between the baseline and 1 hr after trauma for each rat. ADC maps were calculated as previ-

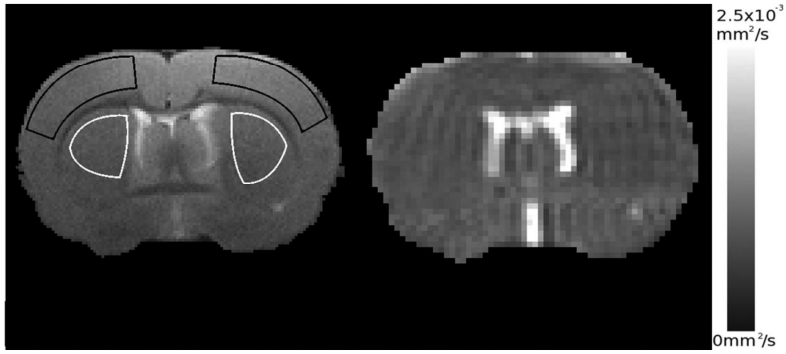


Figure 1. Representative T_2-weighted (*left*) image and apparent diffusion coefficient map (*right*). The two regions of interest, neocortex (*outlined in black*) and caudoputamen (*outlined in white*), are delineated in each hemisphere from the T_2-weighted image.

ously described (18). Four regions of interest were manually drawn on the T_2-weighted images and copied onto to the ADC images: right and left parietal neocortex, right and left caudoputamen (Fig. 1).

Measurements of ERK Phosphorylation

In the first series of experiments, we randomly selected four rat brains from each group after killing the rats at H1 with an intravenous injection of a KCl solution. The pharmacologic inhibitor U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis [2-aminophenylthio] butadiene) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was used to specifically inhibit ERK-1/-2 phosphorylation in the TBI-saline group. The compound U0126 was dissolved in a saline solution containing 10% (v/v) dimethylsulfoxide (vehicle) for stereotactic administration (2 μL × 2; 0.5 mg/mL) into each lateral ventricle 10 mins before trauma. Brain extracts were subjected to gel electrophoresis and immunoblotting as described previously (19). Band intensities of phosphorylated forms were processed with the use of ImageJ software (W Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD) and normalized to their corresponding total forms.

Gravimetric Measurements

In the second series of experiments, BWC in the neocortex and caudoputamen was determined using a gravimetric technique at H6 after TBI (see Section 3 of Supplemental Digital Content 1, http://links.lww.com/CCM/A253).

Motor and Cognitive Tests

The observers (PB, GF, MCF) were blinded to the treatment allocated to each rat for the duration of the third series of experiments. Anesthesia was discontinued after the insult (or equivalent) and the administration of CEPO or saline. Data collected upon termination of anesthesia included: 1) the duration of anesthesia, 2) immediate mortality measured at H6 after removal of the tracheal tube, and 3) the length of time (in seconds) taken for the following reflexes to return during recovery: corneal reflex, hindpaw reflex upon applying a pinch to the paw, head support, and righting when placed on the back (23). We also recorded the time taken for self-tracheal extubation. Once returned to the animal facilities, rats were maintained within a 12-hr light-dark cycle with humidity and temperature controlled at normal levels, and allowed food and water *ad libitum*.

On day 3 (D3) postinjury, neurobehavioral tests were performed on the surviving rats (n = 8 per group). We assessed rats daily, from D3 to day 10 (D10) postinjury, using the adhesive paper removal test to measure somatomotor neglect (24). Two pieces of adhesive-backed paper dots (1 cm^2) were used as bilateral tactile stimuli on the ventral paw of each forelimb. We measured the time taken to remove the first of the two adhesives from the forelimbs, limiting each of the three daily trials, separated by 5-min intervals, to a maximum of 300 secs. In this experiment, rats were trained for 3 days before TBI insult.

From day 6 (D6) to D10 following trauma, the rats were assessed daily using the two-way active avoidance test to explore damage to the retrosplenial cortex through altered stereotypic motor behaviors, such as approach and avoidance (25). The apparatus (rat shuttle box LE 916, Panlab, S.L. Barcelona, Spain), located in a quiet experimental room, consisted of two equally sized compartments (25 cm × 25 cm × 27 cm) with two independent grid floors, connected by a gate (8 cm × 8 cm). The floor was composed of stainless steel bars wired to the electrical stimulus generator. The rat was placed inside one compartment and left undisturbed for 5 mins. After this period, we conducted a series of ten trials, leaving 30-sec intervals between each. A conditioning-combined stimulus, comprising visual light (10 W) and acoustic (500 Hz, 60 dB) stimuli, was delivered for 5 secs followed by a nonconditioning electrical shock stimulus delivered to the rat's paws (0.5 mA). Both the conditioning and nonconditioning stimuli terminated simultaneously after 10 secs. We identified a correct avoidance response as the rat moving to the opposite (dark) compartment within the first 5 secs of the trial, before onset of the electrical shock.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean ± SD. After receiving either saline or CEPO, sham-operated rats were pooled into a single group since no statistically significant differences

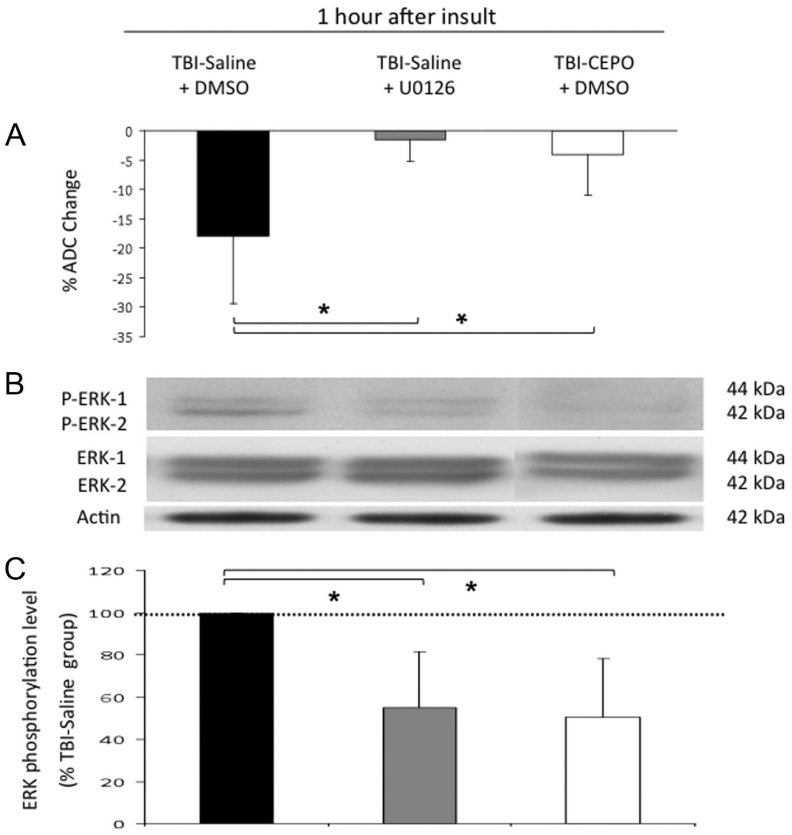


Figure 2. *A*, Changes (in percent) in averaged apparent diffusion coefficient (*ADC*) values of water in the neocortex and caudoputamen (four regions of interest) between baseline and 1 hr (*H1*) after traumatic brain injury (*TBI*) in three groups of rats (n = 10 rats per group): TBI-saline and TBI-carbamylated erythropoietin (*CEPO*) groups received intracerebral administration of dimethylsulfoxide (*DMSO*) (vehicle) before injury. A third group of TBI-saline rats received intracerebral administration of U0126 extracellular-regulated kinase (*ERK*)-1/-2 inhibitor before injury. *B*, Western Blot analysis of the phosphorylation of ERK-1/-2 after electrophoresis of brain extracted 1 hr after the insult. Results are representative of four independent experiments. *C*, Quantitative analysis of the phosphorylated-ERK/ERK ratios after TBI, expressed as a percentage of TBI-saline phosphorylation level (n = 4 rats per group). Data are expressed as mean ± SD. $*p < .05$.

were found between these groups with regards to treatment. Analysis for statistical significance of temporal changes was performed with a two-way (group × repeated values) analysis of variance for repeated measurements (StatView SE program, SAS Institute, Cary, NC). Each value was compared with that obtained at the reference time using the Scheffé *F* test as a *post hoc* test (intragroup analysis). The chi-square and the nonparametric Kruskal-Wallis tests were performed for categorical and continuous variables, respectively (intergroup analysis). Bonferroni's correction was applied for multiple comparisons where appropriate. Statistical significance was declared when $p < .05$.

RESULTS

CEPO Reduces TBI-Induced Edema Formation and Modulates ERK Phosphorylation

In the first series of experiments, averaged ADC of the four regions of interest was significantly reduced at H1 in the TBI-saline group in comparison with their baseline values: −18% ± 12% (ΔADC = ADC at H1 − ADC at H0 = $-0.17 \pm 0.14 \times 10^{-3}$ mm^2/sec) ($p < .01$; Fig. 2*A*). Inhibition of the phosphorylation of ERK-1/-2 by U0126 before injury blocked these TBI-induced changes in ADC at H1: −2% ± 4% (ΔADC = $-0.01 \pm 0.04 \times 10^{-3}$ mm^2/sec). Similarly, we observed no changes in ADC in the TBI-CEPO group at H1: −4% ± 7% (ΔADC = $-0.04 \pm 0.08 \times 10^{-3}$ mm^2/sec). Changes in the phosphorylation levels of the protein kinase ERK-1/-2 paralleled those in ADC for each group (Fig. 2, *B* and *C*). Hence, there was a reduction in phosphorylation levels of ERK-1 and ERK-2 isoforms at H1 in both the TBI-saline group pretreated with U0126 ERK-1/-2 inhibitor, and the TBI-CEPO group ($p < .05$ vs. TBI-saline).

In the second series of experiments, the three groups had comparable physiologic parameters throughout the study period, i.e., arterial blood pressure, blood gases, hemoglobin content, and rectal temperature. We observed no significant ADC changes over the studied time period in either the neocortex or the caudoputamen for all three groups (TBI-saline, TBI-CEPO, and sham-operated). However, mean ADC values in both the neocortex and caudoputamen between H4 and H6 were consistently lower in the TBI-saline group: $0.589 \pm 0.129 \times 10^{-3}$ mm^2/sec vs. $0.768 \pm 0.127 \times 10^{-3}$ mm^2/sec (TBI-CEPO), and $0.768 \pm 0.053 \times 10^{-3}$ mm^2/sec (sham-operated), ($p < .01$ vs. TBI-saline) (Fig. 3*A* and *B*). At H6, BWC as measured by the gravimetric technique in both the neocortex and the caudoputamen was significantly lower in the TBI-CEPO group than in the TBI-saline group: 78.7% ± 0.5% vs. 79.8% ± 0.7%, and 77.7% ± 0.4% vs. 78.9% ± 0.4%, respectively ($p < .05$) (Fig. 4). No differences in BWC were found between the TBI-CEPO and sham-operated groups.

CEPO Improves Neurologic Outcome

The duration of anesthesia was comparable between groups: 50 ± 12 mins, 50 ± 10 mins, and 53 ± 15 mins in the TBI-saline, TBI-CEPO, and sham-operated groups, respectively. Rat mortality during recovery for these groups was five of 13, one of 9, and zero of eight, respectively (chi-square test; $p = .07$). Compared to the weight preinjury, the weight loss at D10 postinjury was higher in the TBI-saline group than in the two other groups: −23 ± 15 g vs. 9 ± 19 g (TBI-CEPO) and 2 ± 18 g (sham-operated) ($p = .05$ vs. TBI-saline).

The return of all tested reflexes following injury took significantly longer in the TBI-saline group than in the sham-operated group (all $p < .05$) (Fig. 5). The TBI-CEPO group showed delays in reflex return that were intermediate between

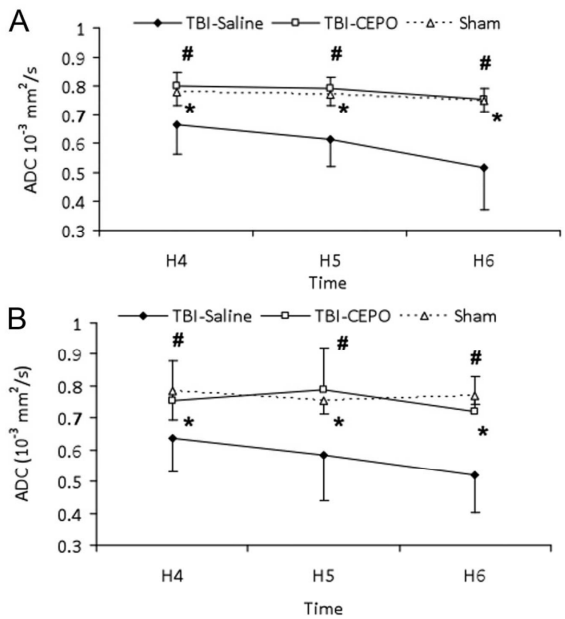


Figure 3. Time course of apparent diffusion coefficient (*ADC*) values in caudoputamen (*A*) and in neocortex (*B*) in the three groups of rats (n = 10 rats per group): sham-operated, traumatic brain injury (*TBI*)-saline, TBI-carbamylated erythropoietin (*CEPO*). Traumatic brain insult was delivered at baseline (*H0*) in TBI-saline and TBI-CEPO groups. Data are expressed as mean ± SD. *$p < .05$ TBI-saline vs. sham-operated; #$p < .05$ TBI-saline vs. TBI-CEPO.

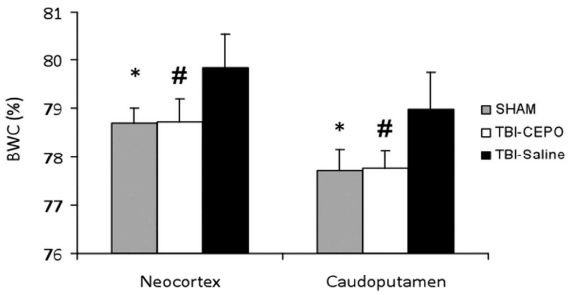


Figure 4. Brain water content (*BWC*) measured by the gravimetric technique in neocortex and in caudoputamen 6 hrs after insult in three groups of rats (n = 10 rats per group): sham-operated, traumatic brain injury (*TBI*)-saline and TBI-carbamylated erythropoietin (*CEPO*). Data are expressed as mean ± SD. *$p < .05$ TBI-saline vs. sham-operated; #$p < .05$ TBI-saline vs. TBI-CEPO.

TBI-saline and sham-operated groups, with corneal, hindpaw, and righting reflexes recovering significantly quicker than in the TBI-saline rats. The TBI-saline group also presented the slowest self-tracheal extubation time: 1180 ± 420 secs vs. 324 ± 129 secs in sham-operated group ($p < .05$).

There was a significant interaction between groups and repeated values over the course of the adhesive removal test (F test = 4.68; $p < .01$) (Fig. 6). This was due to the prolonged reaction time of the TBI-saline group (128 ± 79 secs) by comparison with TBI-CEPO (46 ± 50 secs) and sham-operated (12 ± 8 secs) groups ($p < .05$ vs. TBI-saline). At D10, the time taken to remove adhesive from the forelimbs was 78 ± 86 secs for the TBI-saline group, 12 ± 13 secs (TBI-CEPO), and 7 ± 6 secs (sham-operated group) ($p < .05$ vs. TBI-saline).

There was a significant interaction between groups and repeated values over the course of the avoidance test (F test = 4.96; $p < .01$) (Fig. 7). This was due to fewer correct responses in the TBI-saline group compared to the sham-operated group during the study period ($p < .01$). At D10, the respective percentages of correct avoidance responses for the TBI-saline, TBI-CEPO, and sham-operated groups were 8% ± 10%, 40% ± 26%, and 48% ± 14%, respectively ($p < .05$ vs. TBI-saline).

DISCUSSION

Despite growing interest in the use of CEPO as a neuroprotective agent (3, 5), there remains a paucity of data regarding its beneficial effects in experimental models of TBI. The results of our study show that posttrauma intravenous treatment with CEPO blocks the early development of brain edema and that this antiedematous effect is sustained over a 6-hr time span, promoting neurologic recovery over the 10 days following trauma. With similar effects on posttraumatic brain edema to rhEPO (18), but without the concomitant erythropoietic stimulation, CEPO can thus be considered as a potential agent in the treatment of TBI-induced neuronal damage.

Early posttrauma treatment with CEPO can reduce brain edema, as measured by MRI and the gravimetric technique. We used the impact-acceleration model that causes early, diffuse posttraumatic edema with no disruption to the blood-brain barrier (BBB), as shown by

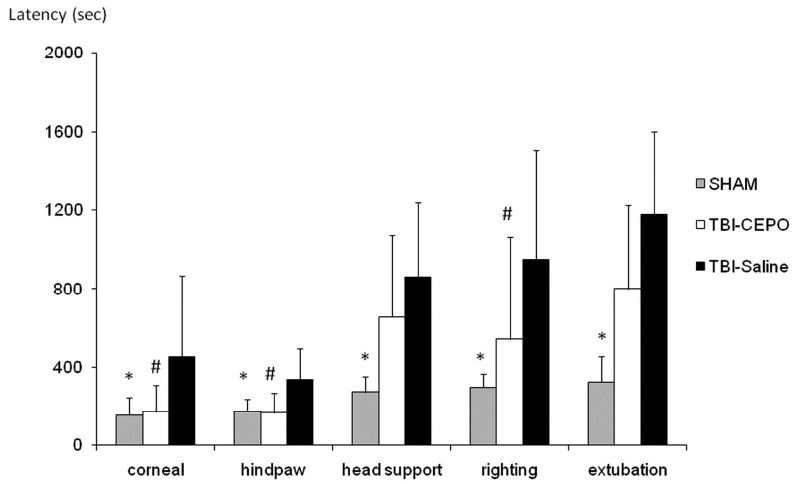


Figure 5. Latency (in seconds) for return of acute neurologic reflexes and for self-tracheal extubation after trauma (or equivalent in the sham-operated group) upon anesthesia termination in the three groups of rats (n = 8 rats per group): sham-operated, traumatic brain injury (*TBI*)-saline, TBI-carbamylated erythropoietin (*CEPO*). Data are expressed as mean ± SD. *$p < .05$ TBI-saline vs. sham-operated; #$p < .05$ TBI-saline vs. TBI-CEPO.

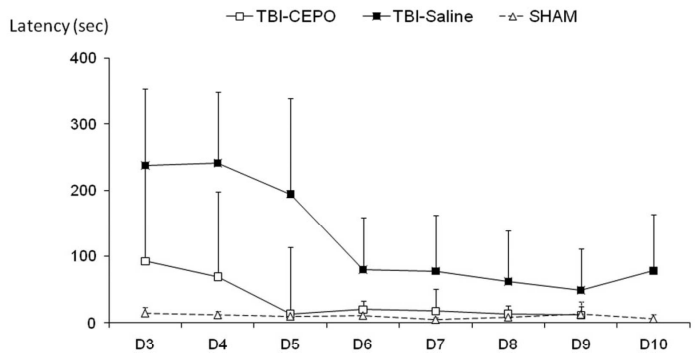


Figure 6. Latency (in seconds) to remove adhesive from the forelimbs from day 3 (*D3*) to day 10 (*D10*) after trauma (or equivalent in the sham-operated group) in the three groups of rats (n = 8 rats per group): sham-operated, traumatic brain injury (*TBI*)-saline, TBI-carbamylated erythropoietin (*CEPO*). Data are expressed as mean ± SD.

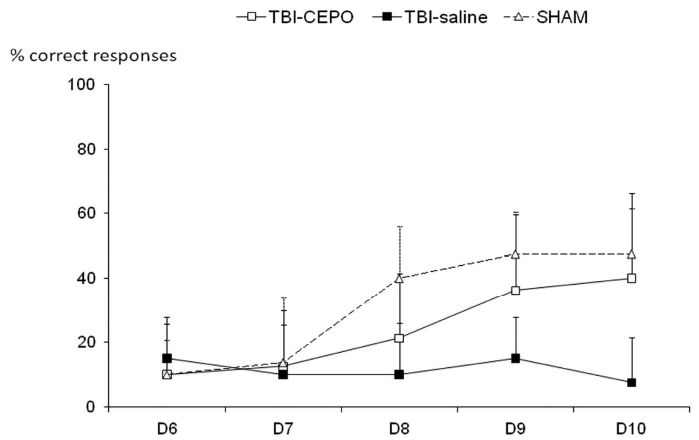


Figure 7. Percentage of correct responses during the active avoidance test from day 6 (*D6*) to day 10 (*D10*) after trauma (or equivalent in the sham-operated group) in the three groups of rats (n = 8 rats per group): sham-operated, traumatic brain injury (*TBI*)-saline, TBI-carbamylated erythropoietin (*CEPO*). Data are expressed as mean ± SD.

an intravenous bolus of gadolinium and Evan's blue marker following impact (26, 27). We also found no BBB opening over the 3-hr time span following TBI, using serial measurements of tissue T_1 during a 60-min infusion of manganese and a gadolinium bolus (19). There was no evidence of BBB damage several days after this type of injury as assessed by MRI (28). The presence of this cellular (cytotoxic) type of edema was constantly reflected by the decreased ADC values seen in our two TBI-saline groups (Figs. 2 and 3), according to the principles of diffusion-weighted MRI (29). Together with the BWC measurements obtained at H6, our results consistently support the beneficial effect of administering CEPO post-TBI to alleviate brain water accumulation. The 0.5% to 1% CEPO-induced reduction in BWC is noteworthy because it might significantly improve brain perfusion in case of closed head injury with low compliance (30). Furthermore, this antiedematous effect was detectable as early as 1 hr after insult, suggesting that CEPO can rapidly cross the undamaged BBB in a time comparable to that previously found for rhEPO (18, 31). Although there are uncertainties regarding the mechanisms by which CEPO mediates its effects across the BBB, these findings lead us to postulate that intravenous injection of CEPO immediately affects the biochemical pathways present in injured brain tissue, including for example, TBI-induced excitotoxic damage, altered calcium homeostasis, and production of free radicals and/or impairment of mitochondrial function. An antiexcitotoxicity effect of CEPO has already been found in mouse hippocampal cell cultures exposed to N-methyl-d-aspartate (32).

In concordance with previous studies (19–21), our results confirm the rapid activation of the ERK signaling pathway and its close association with brain edema development. Cell swelling in cultured astrocytes following *in vitro* trauma is accompanied by the activation of mitogen-activated protein kinases, including ERK-1/-2, and is diminished by mitogen-activated protein kinase inhibitors (33). Treatment with rhEPO is associated with decreased tissue expression of phosphorylated ERK following spinal cord injury (34) as well as TBI (19). Of note in the present study was the similar modulation of ERK-1/-2 phosphorylation levels by CEPO and by preinjury treatment using an ERK inhibitor (Fig. 2). Although the mechanisms by which ERK inhibition affects the development of brain edema are not fully elucidated, recent data suggest that ERK might contribute to the increased aquaporin-4 levels and astrocyte swelling (35). Our results indicate that the ERK signaling pathway is at least one marker of the early intracellular changes induced by CEPO.

In addition to the short-term effects on brain edema, we found improved neurologic outcome in CEPO-treated rats after trauma. Due to its diffuse nature in brain parenchyma (36), the impact-acceleration model of diffuse TBI produces a transient suppression of somatomotor reflexes along with long-lasting deficits in motor and cognitive functioning (23), as shown in our TBI-saline group. The prolonged impairment displayed by this group during the active avoidance test may reflect the neuronal damage caused to the retrosplenial cortex (25). The assessment of neurobehavioral function, performed by observers unaware of the allocated treatment, showed results consistently in favor of a CEPO-induced improvement in motor and behavioral function, in accordance with previous studies using focal TBI (12, 14). The long-term improvements might be attributed to the early reduction of brain posttraumatic edema following CEPO treatment, reflecting limited neuroinflammation and secondary tissue damage. A similar association between reduced brain edema and better neurologic outcome has been found using various neuroprotective agents, such as rhEPO (37, 38), minocycline (39), and progesterone (40). We are currently investigating the course of certain plasma markers of brain injury in this model together with an assessment of brain histology. However, there are likely to be multiple mechanisms implicated in the observed CEPO-induced functional improvement, as has been evidenced by its correlation with reduced hippocampal cell loss and increased vascular density (14).

There were some limitations with our study. Firstly, we used a single dose of 50 μg/kg CEPO administered 30 mins post trauma according to the most popular therapeutic regimen. Although not appropriate for a potential clinical use, this timing was chosen to explore the early effects, if any, of CEPO on the injured brain, as have previously been found with rhEPO (18). We are currently investigating whether repeated doses of CEPO and/or a delayed timing for treatment, i.e., 2 hrs postinjury, are equally effective. In stroke animals, CEPO has been shown to be effective within a therapeutic window of at least 3 hrs (9, 11). Triple dosing of CEPO further reduced lesion volume and improved functional recovery compared with one single dose of CEPO (14). Secondly, the measurements of ADC were performed in the neocortex and caudoputamen, based on their high sensitivity to the injury inflicted in this model (36). Because MRI and neurologic assessments were carried out on different rats, we were unable to establish a causal relationship between the intensity of brain edema in these brain regions and functional recovery. Thirdly, we did not explore the cause of deaths recorded during the immediate recovery phase in the third series of experiments, although we postulate that it was probably due to severe brain lesions and maximal cerebral brain edema following TBI.

In conclusion, our findings add to the growing body of evidence supporting the beneficial effect of administering CEPO following various neuronal injuries. Our results in the rat showed the rapid and sustained reduction in brain edema following diffuse TBI, accompanied by an improved functional recovery following a single dose. Given that CEPO does not stimulate erythropoiesis, these results offer new perspectives in the treatment of TBI.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank H. Lundbeck A/S, Valby, Denmark, for kindly providing the carbamylated erythropoietin. The authors also thank Thomas N. Sager, PhD (H. Lundbeck A/S, Valby, Denmark) for his helpful comments on the manuscript, and the MRI facility of the Grenoble Institut des Neurosciences for its experimental support. We also thank Jana Dunbar (Medical College of Virginia, Richmond, VA) for her assistance with the TBI model.

REFERENCES

1. Gassmann M, Heinicke K, Soliz J, et al: Non-erythroid functions of erythropoietin. *Adv Exp Med Biol* 2003; 543:323–330
2. Brines M, Cerami A: Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6:484–494
3. Velly L, Pellegrini L, Guillet B, et al: Erythropoietin 2nd cerebral protection after acute injuries: A double-edged sword? *Pharmacol Ther* 2010; 128:445–459
4. Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H, et al: Recombinant human erythropoietin in

the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke* 2009; 40:e647–e656
5. Lapchak PA: Carbamylated erythropoietin to treat neuronal injury: New development strategies. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; 17:1175–1186
6. Leist M, Ghezzi P, Grasso G, et al: Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* 2004; 305: 239–242
7. Kirkeby A, Torup L, Bochsen L, et al: High-dose erythropoietin alters platelet reactivity and bleeding time in rodents in contrast to the neuroprotective variant carbamyl-erythropoietin (CEPO). *Thromb Haemost* 2008; 99:720–728
8. Villa P, van Beek J, Larsen AK, et al: Reduced functional deficits, neuroinflammation, and secondary tissue damage after treatment of stroke by nonerythropoietic erythropoietin derivatives. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27:552–563
9. Wang Y, Zhang ZG, Rhodes K, et al: Post-ischemic treatment with erythropoietin or carbamylated erythropoietin reduces infarction and improves neurological outcome in a rat model of focal cerebral ischemia. *Br J Pharmacol* 2007; 151:1377–1384
10. King VR, Averill SA, Hewazy D, et al: Erythropoietin and carbamylated erythropoietin are neuroprotective following spinal cord hemisection in the rat. *Eur J Neurosci* 2007; 26:90–100
11. Lapchak PA, Kirkeby A, Zivin JA, et al: Therapeutic window for nonerythropoietic carbamylated-erythropoietin to improve motor function following multiple infarct ischemic strokes in New Zealand white rabbits. *Brain Res* 2008; 1238:208–214
12. Mahmood A, Lu D, Qu C, et al: Treatment of traumatic brain injury in rats with erythropoietin and carbamylated erythropoietin. *J Neurosurg* 2007; 107:392–397
13. Adembri C, Massagrande A, Tani A, et al: Carbamylated erythropoietin is neuroprotective in an experimental model of traumatic brain injury. *Crit Care Med* 2008; 36: 975–978
14. Xiong Y, Mahmood A, Zhang Y, et al: 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; 114:549–559
15. Unterberg AW, Stover J, Kress B, et al: Edema and brain trauma. *Neuroscience* 2004; 129:1021–1029
16. Vink R, Nimmo AJ: Multifunctional drugs for head injury. *Neurotherapeutics* 2009; 6:28–42
17. Francony G, Fauvage B, Falcon D, et al: Equimolar doses of mannitol and hypertonic saline in the treatment of increased intracranial pressure. *Crit Care Med* 2008; 36: 795–800
18. Verdonck O, Lahrech H, Francony G, et al: Erythropoietin protects from post-traumatic edema in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27:1369–1376
19. Valable S, Francony G, Bouzat P, et al: 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; 30: 361–369
20. Mori T, Wang X, Jung JC, et al: Mitogen-activated protein kinase inhibition in traumatic brain injury: In vitro and in vivo effects. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 444–452
21. Otani N, Nawashiro H, Fukui S, et al: Role of the activated extracellular signal-regulated kinase pathway on histological and behavioral outcome after traumatic brain injury in rats. *J Clin Neurosci* 2007; 14:42–48
22. Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, et al: A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg* 1994; 80:291–300
23. Beaumont A, Marmarou A, Czigner A, et al: The impact-acceleration model of head injury: Injury severity predicts motor and cognitive performance after trauma. *Neurol Res* 1999; 21:742–754
24. Freret T, Valable S, Chazalviel L, et al: Delayed administration of deferoxamine reduces brain damage and promotes functional recovery after transient focal cerebral ischemia in the rat. *Eur J Neurosci* 2006; 23: 1757–1765
25. Lukoyanov NV, Lukoyanova EA: Retrosplenial cortex lesions impair acquisition of active avoidance while sparing fear-based emotional memory. *Behav Brain Res* 2006; 173:229–236
26. Beaumont A, Marmarou A, Hayasaki K, et al: The permissive nature of blood brain barrier (BBB) opening in edema formation following traumatic brain injury. *Acta Neurochir Suppl* 2000; 76:125–129
27. Beaumont A, Fatouros P, Gennarelli T, et al: Bolus tracer delivery measured by MRI confirms edema without blood-brain barrier permeability in diffuse traumatic brain injury. *Acta Neurochir Suppl* 2006; 96:171–174
28. Barzó P, Marmarou A, Fatouros P, et al: Contribution of vasogenic and cellular edema to traumatic brain swelling measured by diffusion-weighted imaging. *J Neurosurg* 1997; 87:900–907
29. Huisman TA: Diffusion-weighted imaging: Basic concepts and application in cerebral stroke and head trauma. *Eur Radiol* 2003; 13:2283–2297
30. Frei HJ, Wallenfang T, Pöll W, et al: Regional cerebral blood flow and regional metabolism in cold induced oedema. *Acta Neurochir (Wien)* 1973; 29:15–28
31. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, et al: Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 10526–10531
32. Montero M, Poulsen FR, Noraberg J, et al: Comparison of neuroprotective effects of erythropoietin (EPO) and carbamylerythropoietin (CEPO) against ischemia-like oxygen-glucose deprivation (OGD) and NMDA excitotoxicity in mouse hippocampal slice cultures. *Exp Neurol* 2007; 204:106–117
33. Jayakumar AR, Rao KV, Panickar KS, et al: Trauma-induced cell swelling in cultured astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008; 67:417–427
34. Huang H, Fan S, Ji X, et al: 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; 37:511–519
35. Rao KV, Jayakumar AR, Reddy PV, et al: Aquaporin-4 in manganese-treated cultured astrocytes. *Glia* 2010; 58:1490–1499
36. Foda MA, Marmarou A: A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg* 1994; 80: 301–313
37. Grasso G, Sfacteria A, Meli F, et al: Neuroprotection by erythropoietin administration after experimental traumatic brain injury. *Brain Res* 2007; 1182:99–105
38. Shein NA, Grigoriadis N, Alexandrovich AG, et al: Differential neuroprotective properties of endogenous and exogenous erythropoietin in a mouse model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2008; 25:112–123
39. Homsi S, Federico F, Croci N, et al: Minocycline effects on cerebral edema: Relations with inflammatory and oxidative stress markers following traumatic brain injury in mice. *Brain Res* 2009; 1291:122–132
40. Cutler SM, Cekic M, Miller DM, et al: Progesterone improves acute recovery after traumatic brain injury in the aged rat. *J Neurotrauma* 2007; 24:1475–1486

Etude 1
Résultats complémentaires

1. Effet de la CEpo sur le pore mitochondrial de transition de perméabilité et l'apoptose caspase-dépendante

Contexte

La CEpo, dans un modèle de TC *in vitro*, a permis de diminuer la mort cellulaire post-traumatique (Adembri, Massagrande et al. 2008). Cette activité protectrice vis-à-vis des tissus lésés a pu être également retrouvée dans un modèle *in vivo* d'ischémie myocardique (Fiordaliso, Chimenti et al. 2005). Notre hypothèse a donc été que la CEpo pourraît avoir une activité anti-apoptotique en augmentant la résistance du mPTP à une surcharge calcique, diminuant ainsi l'activation des voies pro-apoptotiques médiées par les caspases, notamment la caspase-3.

Méthodologie spécifique

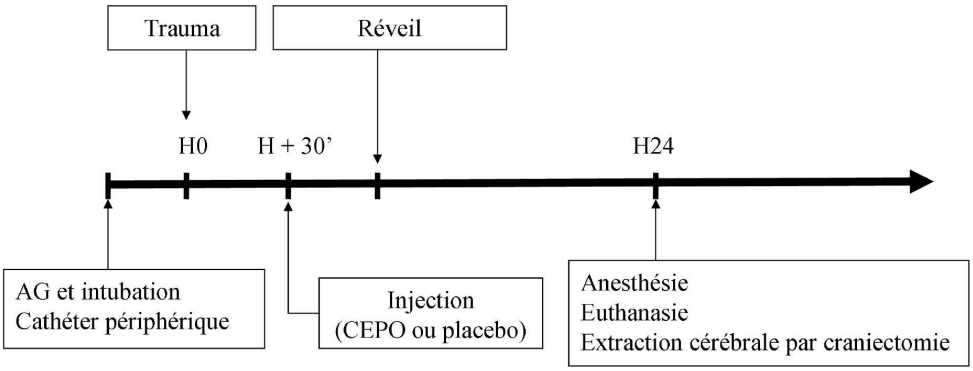
Les animaux inclus dans deux séries d'expériences étaient divisés en 3 groupes :

- Traumatisés et traités par CEPO (50µg/Kg, 30 min IV post-TC): TBI-CEPO
- Traumatisés et traités par placebo (sérum physiologique) : TBI-Saline
- Non traumatisés (Sham) recevant une injection de CEPO ou de Placebo

Dans une première série d'expériences, les rats (n=10 par groupe), intubés ventilés mécaniquement sous anesthésie générale étaient sacrifiés pour extraire les mitochondries cérébrales à H+2 après le TC selon le protocole détaillé dans la partie méthodologie générale (page 102) afin d'étudier la capacité de rétention calcique.

Dans une deuxième série d'expériences, les rats (n=5 par groupes) étaient réveillés après la réalisation du TC et de l'équipement puis sacrifiés 24

heures après le TC afin d'étudier l'apoptose médiée par les caspases-3 (Chronogramme ci-dessous) selon la technique immunohistochimique décrite dans la partie méthodologie générale (pages 99 - 100).



Résultats

Les paramètres biologiques mesurés entre les groupes n'étaient pas différents entre les 3 groupes ; le délai de prélèvement des mitochondries a été supérieur dans le groupe Sham par rapport au groupe TBI-Saline et TBI-CEPO (Tableau 2)

	Sham	TBI-CEPO	TBI-Saline	p
Poids (g)	397 ± 54	429 ± 33	430 ± 42	NS
PO_2 (mmHg)	141 ± 29	114 ± 19	131 ± 19	NS
PCO_2 (mmHg)	39 ± 11	33 ± 7	35 ± 5	NS
pH	7,41 ± 0,07	7,41 ± 0,04	7,40 ± 0,07	NS
HCO_3^- (mmol/L)	23,5 ± 7,5	18,3 ± 2,6	20,4 ± 3,7	NS
Hémoglobine (g/dL)	12,5 ± 1,7	11,9 ± 1,3	12,5 ± 1,1	NS
Lactate (mmol/L)	2,9 ± 0,7	3,1 ± 0,5	2,8 ± 0,6	NS
Glucose (mmol/L)	14,1 ± 4,3	10,2 ± 3,7	11,6 ± 2,7	NS
Délai (mn)	141 ± 22	113 ± 8	127 ± 15	<0,01

Tableau 2: Paramètres biologiques et délai de prélèvement entre les 3 groupes. Les données sont exprimées en moyenne ± déviation standard. PO_2 = Pression partielle en oxygène, PCO_2 = Pression Partielle en Dioxyde de Carbone, HCO_3^- = Bicarbonates.

Concernant la capacité de rétention calcique, les résultats sont résumés dans la Figure 43. Le nombre de pics nécessaire à l'obtention de l'ouverture du mPTP était inférieure dans le groupe TBI-CEPO par rapport au groupe TBI-Saline en présence du Succinate (5,6 ± 0,8 vs 4 ± 0,67 ; p<0,01) ou du Glutamate - Malate (9,3 ± 1,6 vs 7,2 ± 1,3 ; p<0,01). En revanche il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les groupes TBI-Saline et Sham en présence du Succinate (4 ± 0,67 vs 4,9 ± 0,9 ; p=0,03) ou du Glutamate - Malate (7,2 ± 1,3 vs 8,1 ± 1,1 ; p=0,21). Il en est de même pour la comparaison entre les groupes Sham et TBI-CEPO en présence de Succinate (4,9 ± 0,9 vs 5,6 ± 0,8 ; p=0,11) ou de Glutamate – Malate (8,1 ± 1,1 vs 9,6 ± 1,6 ; p=0,05). En présence de ciclosporine A on ne retrouvait pas de différence significative entre les 3 groupes que ce soit en présence de Succinate (8 ± 0,8 vs 8,3 ± 1,5 vs 6,8 ± 1,7 ; p=0,09) ou de Glutamate – Malate (11 ± 1,3 vs 12 ± 1,7 et 10,5 ± 1,8 ; p=0,08). En revanche, l'ajout de ciclosporine A *in vitro* augmentait de manière significative le nombre de pics quelque soit le groupe. Sur l'ensemble des animaux de l'étude, le nombre de pics moyens en présence de Succinate passait de 4,8 ± 1,0 à 7,7 ± 1,5 après ajout de CSA (p < 0,01) et de 8,2 ± 1,6 à 11,2 ± 1,7 en présence de Glutamate Malate (p<0,01), résultats non montrés.

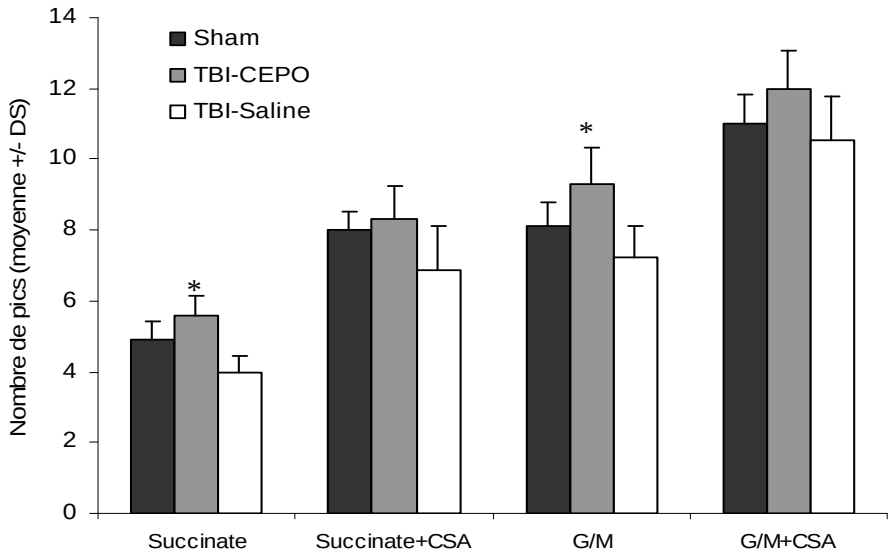


Figure 43: Nombre de pics pour les 3 groupes (expérience n°1) selon le substrat de la chaine respiratoire ajouté (succinate ou Glutamate/Malate, G/M) et selon l'ajout *in vitro* de ciclosporine A (CSA). * p<0,05 *vs* TBI-Saline

Concernant l'apoptose, Il existe une différence statistiquement significative entre les groupes Sham et TBI-Saline (5,3 ± 1,6% vs 10,9 ± 1,1% ; p=0,009) sans différence significative entre les groupes Sham et TBI-CEPO (5,3 ± 1,6% vs 6,8 ± 4,1% ; p=0,75) et TBI-CEPO et TBI-Saline (6,8 ± 4,1 vs 10,9 ± 1,1% ; p=0,11). Ces résultats sont présentés dans la figure 44.

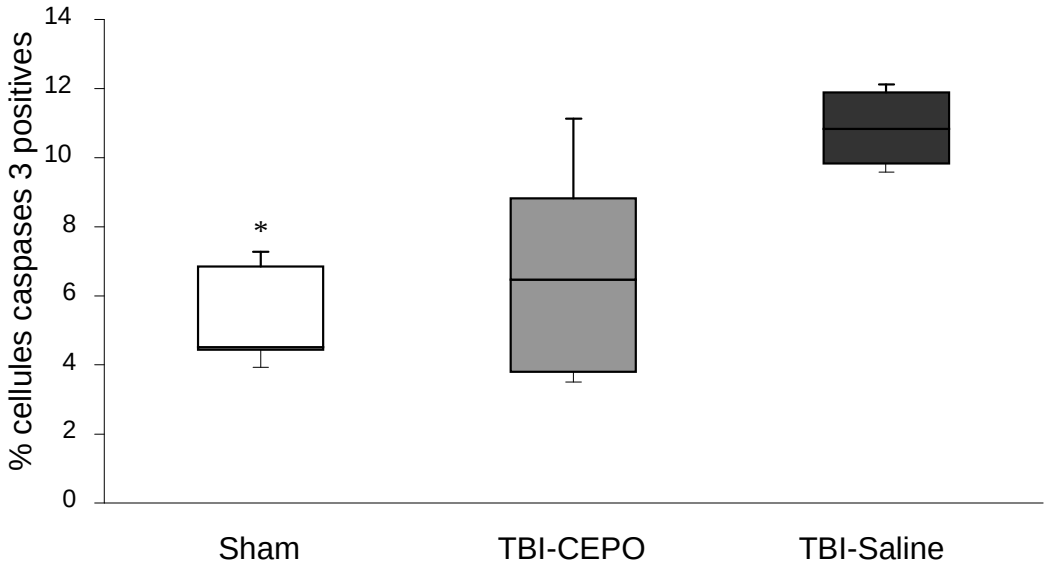


Figure 44 : Pourcentage de cellules exprimant les caspases-3 selon les groupes de rat (expérience n°2). * p<0,05 *vs* TBI-Saline.

Discussion

Les résultats de cette étude montrent que la CEPO injectée après la réalisation d'un TC expérimental augmente le seuil d'ouverture du mPTP et diminue l'apoptose cellulaire cérébrale. Ces résultats complètent les propriétés neuroprotectrices de la CEPO décrites dans l'étude 1 et supportent également l'utilisation de thérapeutiques ciblant la mitochondrie dans le TC.

La dysfonction mitochondriale est un évènement post-traumatique connu après un TC comme en témoigne l'élévation du taux de lactate extra-cellulaire chez des patients traumatisés malgré un DSC correct et une oxygénation cérébrale correcte (Bergsneider, Hovda et al. 1997). L'augmentation du calcium intracellulaire est un évènement clé de la dysfonction mitochondriale. Ainsi une élévation du calcium intramitochondrial est susceptible d'induire l'ouverture du

mPTP et l'activation de voies de signalisations intracellulaires pro-apoptotiques. L'ouverture du mPTP induit un arrêt de la production d'ATP par perte du potentiel trans-membranaire et le relargage dans le cytosol de protéines pro-apoptotiques comme le cytochrome C, la caspase-9 et -3 (Galluzzi, Blomgren et al. 2009).

Dans notre modèle de traumatisme cérébral diffus fermé, les mitochondries cérébrales des rats traumatisés non traités présentent une baisse du seuil de transition de perméabilité par rapport aux rats traumatisés traités par CEPO quelque soit le substrat de la chaîne respiratoire mitochondriale utilisé. Il existe une tendance à la baisse de la capacité de rétention calcique du groupe traumatisé non traité par rapport au groupe Sham à la limite de la significativité. L'ajout de ciclosporine A *in vitro* s'est révélé être un puissant inhibiteur du mPTP. Ce bénéfice attendu ne semble pas additif à celui associé à la CEPO, puisqu'il n'existe pas de différence significative entre les groupes lorsque la réaction à lieu en présence de CSA *in vitro*, suggérant une voie commune d'action de ces deux produits au sein de la mitochondrie.

L'expression de la caspase 3, quant à elle, a été fortement augmentée dans le groupe traumatisé non traité par rapport au groupe non traumatisé. Il existe de plus une tendance forte à la réduction de cette expression dans le groupe traité par CEPO qui reste à la limite de la significativité. L'augmentation du collectif de chaque groupe devrait rendre ce résultat significatif. Une diminution de la mort cellulaire post-traumatique par la CEPO a, par ailleurs, déjà été décrite (Adembri, Massagrande et al. 2008) soutenant nos constations.

Malgré le rationnel existant autour de l'ouverture du mPTP et l'apoptose caspase-3 médiée, aucun lien formel ne peut être établi dans notre étude entre les observations faites sur l'effet de la CEPO sur le mPTP et la diminution de l'apoptose caspase-3 médiée.

2. Effet de l'administration retardée de la CEpo

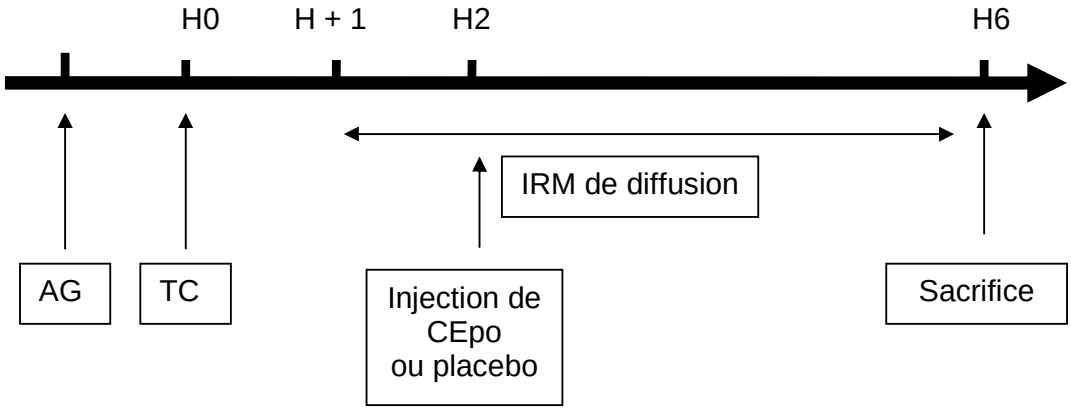
Contexte

Un traitement par CEpo 30 minutes après le traumatisme crânien constitue un délai peu accessible en clinique. Une administration retardée, deux heures après le TC, semble plus adaptée chez l'homme. Nous avons donc voulu tester l'action de la CEpo sur l'œdème cérébral post-traumatique dans notre modèle expérimental de TC diffus lorsqu'elle était injectée par voie intraveineuse 2 heures après le traumatisme crânien.

Méthodologie spécifique

3 groupes de rats ont été étudiés : un premier groupe (TBI-CEPO) était traumatisé puis traité par CEpo (50µg/Kg, IV) deux heures après le TC, un deuxième groupe (TBI-Saline) était traumatisé recevant un placebo (serum physiologique) 2 heures après le TC et enfin un groupe de rats témoins (Sham) n'était pas traumatisé mais recevait soit du placebo (serum physiologique) soit de la CEpo (50µg/Kg).

L'évolution de l'œdème cérébral était effectuée par mesure de l'ADC en IRM de diffusion à 7T toutes les heures de la première à la sixième heure post-traumatique (Chronogramme ci-dessous).



Résultats

L'évolution de l'ADC a été différente entre les 3 groupes (p<0,01). L'ADC du groupe TBI-Saline diminuait entre H3 et H6 comparé à H1 (apparition d'un œdème cérébral) alors que les ADC des deux autres groupes étaient stables. L'analyse intergroupe a montré une augmentation de l'ADC dans le groupe TBI-CEPO, avec un ADC à H6 plus élevé que dans le groupe TBI-Saline (ADC=0.80 x 10^{-3} ± 0.06 x 10^{-3} mm^2/sec vs 0.72 x 10^{-3} ± 0.05 x 10^{-3} mm^2/sec, p = 0,04). Aucune difference d'ADC n'a été retrouvée à H6 entre le groupe TBI-CEPO et le groupe Sham (Figure 45).

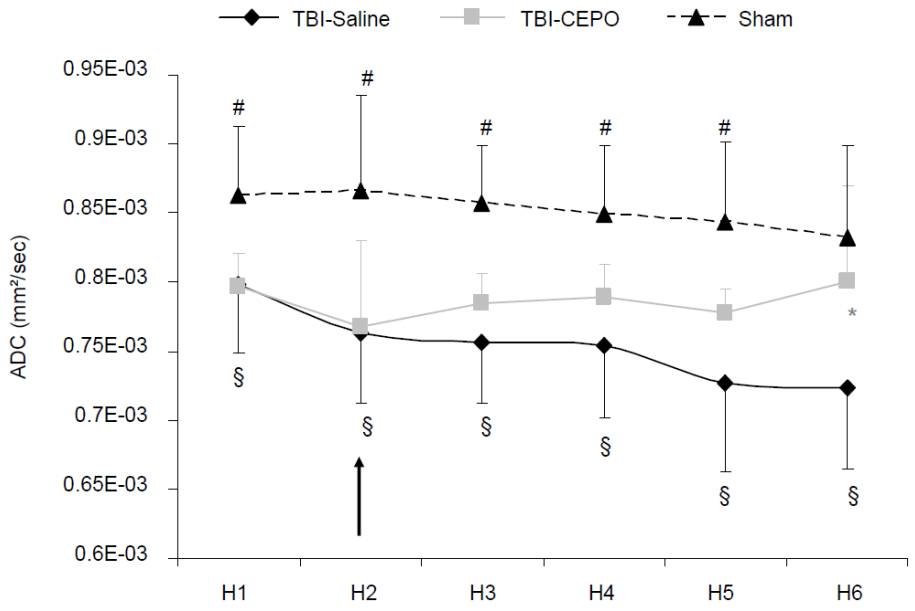


Figure 45: Evolution de l'ADC dans les 3 groupes d'animaux. Le traitement était injecté deux heures après le TC (Flèche noire). * p<0,05 TBI-CEPO *vs* TBI-Saline ; § p <0,05 TBI-Saline *vs* Sham ; # p<0,05 Sham *vs* TBI-CEPO.

Discussion

Les résultats de cette étude montrent que la CEPO injectée deux heures après un TC diffus expérimental est capable de réverser le développement de l'œdème cérébral post-traumatique.

Dans notre modèle d'impact-accélération, nous avons déjà démontré que la CEPO est capable de diminuer l'œdème cérébral lorsqu'elle est injectée 30 minutes après le TC (Etude 1). Même si ce délai constitue le temps habituel d'un traitement par CEPO en expérimental, celui-ci semble peu approprié pour une utilisation clinique. Dans l'ischémie cérébrale, la CEPO a pu diminuer la taille de l'infarctus cérébral après une injection au moins 3 heures après l'ischémie (Wang, Zhang et al. 2007). Dans un modèle de TC focal, l'administration de CEPO 6 heures après le traumatisme a permis de réduire les déficits fonctionnels et histologiques (Mahmood, Lu et al. 2007; Xiong, Mahmood et al. 2011). En accord avec ces études nous avons observé un effet anti-oedémateux de la CEPO après une injection retardée.

Les mécanismes impliqués dans cet effet pourraient être en lien avec l'inhibition de la phosphorylation d'une MAPKinase : Erk (Etude 1). Dans d'autres modèles, l'activation des MAPK ont été associés avec un œdème cellulaire de cellules astrocytaires après un stress oxydant (Moriyama, Jayakumar et al. 2010) ou un traumatisme (Jayakumar, Rao et al. 2008). Un autre mécanisme cellulaire impliqué pourrait être médié par les aquaporines 4, et nous travaillons actuellement à la compréhension du rôle de ce canal membranaire dans l'œdème cérébral post-traumatique.

Etude 2

Validation de la cartographie *in vivo* de la saturation locale en oxygène du cerveau par IRM et application au traumatisme crânien expérimental

1. Contexte

Le fonctionnement cerebral depend étroitement des apports en oxygène. Les mécanismes de régulation de cet apport d'oxygène cependant sont largement méconnus (Gordon, Choi et al. 2008). La réalisation de cartographies de l'oxygénation cérébrale pourrait ainsi être utile à la fois pour explorer le fonctionnement cérébral normal mais aussi pour étudier le cerveau en pathologie.

Les méthodes existantes pour cartographier l'oxygénation tissulaire cérébrale sont performantes mais comportent également de nombreuses limites. L'utilisation la TEP notamment est limitée par une demi-vie des traceurs radioactifs de l'oxygène très courte. De plus les autres traceurs à la demi-vie plus longue comme le pimonidazole n'indiquent seulement que les zones très hypoxiques (PO_2 < 10 mmHg). Les marqueurs histologiques comme GLUT-1 ou CAIX ne correspondent pas au marquage par le pimonidazole (Rademakers, Lok et al. 2011).

L'utilisation du contraste BOLD en IRM permet d'obtenir des cartes d'extraction de l'oxygène. He et coll. ont été les premiers à décrire les principes du BOLD quantitatif (He et Yablonskiy 2007). Nous rapportons ici la réalisation de cartographies de lSO_2 combinant la mesure du contraste BOLD avec une détermination du volume sanguin cérébral (*blood volume fraction, BVf*). Afin de valider cette méthodologie RMN, nous avons étudié les cartes de lSO_2 obtenues pour différentes conditions d'oxygénation chez des rats sains. Cette technique a ensuite été appliquée au modèle de TC expérimental d'impact-accélération, ainsi qu'au modèle d'ischémie cérébrale focale.

2. Méthodologie spécifique à l'étude

2.1. Influence de la FiO_2 sur la mesure IRM de la ISO_2

Préparation des animaux

Pour cette étude, des rats males Wistar (350-450g) sains ont été utilisés. Les rats étaient maintenus sous anesthésie générale (Isoflurane 2%) durant toutes les expérimentations. Des cathéters (22 Gauges) étaient insérés dans l'artère et la veine fémorales par microchirurgie afin de prélever des gaz du sang (100µl maximum) et effectuer les injections intraveineuses.

Variation des conditions d'oxygénation

Les différentes conditions d'oxygénation ont été réalisées en variant la fraction inspirée d'oxygène par les rats sous AG. L'hyperoxie était obtenue avec 100% d'O_2 dans le mélange gazeux inhalé, la normoxie avec un mélange contenant de l'O_2 à 30% et de l'air à 70%, l'hypoxie modérée avec 100% d'air et l'hypoxie profonde avec 30% d'air et 70% d'azote. La durée de chaque condition d'oxygénation n'exédait pas 10 minutes ; la validité de la condition était attestée par des gaz du sang artériel avec un objectif de PaO_2 d'environ 350 mmHg pour l'hyperoxie, 150 mmHg pour la normoxie, 75 mmHg pour l'hypoxie modérée et 40 mmHg pour l'hypoxie profonde. Les gaz du sang étaient prélevés après une stabilisation de la condition d'oxygénation de 1 minute.

Protocole expérimental

Dans une première série d'expériences, la saturation du sinus longitudinal supérieur (SsO_2) a été mesurée au cours des différentes conditions de FiO_2 afin d'étudier la corrélation entre la mesure de la SsO_2 et la mesure de la SvO_2 fémorale chez des rats sains (n=11). Cette relation entre SsO_2 et SvO_2 fémorale permettrait ainsi d'estimer la SsO_2 (*SSS converted*) à partir de la mesure de la SvO_2 fémorale chez des rats sains.

Dans une deuxième série d'expériences, la mesure de la $PtiO_2$ a été réalisée grâce à une fibre optique implantée dans le caudoputamen afin d'étudier la corrélation entre les mesures de $PtiO_2$ et les mesures de la SsO_2 estimée par la SvO_2 fémorale pour les différentes conditions d'oxygénation chez 5 rats sains.

Enfin dans une troisième série d'expériences, la mesure de la lSO_2 cérébrale a été réalisée par IRM à 4,7T sous différentes conditions d'oxygénation afin d'étudier la corrélation entre les valeurs de lSO_2 (substance grise et substance blanche) et les valeurs de SsO_2 estimées par la mesure de la SvO_2 fémorale chez 17 rats sains. Toutes les acquisitions ont été réalisées avec la même géométrie (5 coupes adjacentes, 1mm d'épaisseur, FOV=30x30 mm, matrice= 64x64). Le protocole d'acquisition fût le suivant :

- **Carte de VSC** : la mesure de volume sanguin a été réalisée comme décrit dans le chapitre *Méthodologie générale* à l'aide de deux acquisitions multi-echos de gradient (TR=6000ms, ΔTE = 3 ms, 5 échos) réalisées avant et 2 minutes après l'injection IV d'USPIO (200µmol Fe/kg, Sinerem, Guerbet, Roissy, France ; Combidex, AMAG Pharmaceuticals, Inc., MA, USA). Le changement de susceptibilité magnétique du sang induit par la présence de particules de fer dans les vaisseaux a été fixé à 0,28ppm pour une expérimentation réalisée à 4,7T.
- **Carte T_2 (ms)** : une séquence « mutli-slice multi echo 2D » (MSME) a été réalisée avec les paramètres suivants : TR=1500 ms, 20 échos de spin=12-228ms, ΔTE=12 ms.
- **Carte T_2* (ms)** : une séquence « mutli-gradient echo 3D » (MGE2D) à haute résolution a été réalisée avec les paramètres suivants : TR =1500 ms, 30 échos de gradients = 4-60ms, ΔTE = 2,5 ms.

La **carte de lSO_2** (%) a été calculée, pixel par pixel, à partir des différentes cartes R_2 (=1/T2), R_2* (=1/T_2*) et VSC comme décrit dans la Figure 21, en utilisant une valeur d'hématocrite microvasculaire (Hct) constante de 0,357 et une différence de susceptibilité magnétique entre l'oxy et la déoxyHb de $\Delta_{\chi 0}$=0,264ppm.

2.2 Application de la mesure IRM de la lSO_2 dans un modèle de TC

Deux groupes de rats ont été utilisés dans cette expérience : un groupe témoin (Sham, n=10) et un groupe traumatisé (TC, n=5) selon notre modèle expérimental. Les animaux étaient équipés sous anesthésie générale d'un cathéter artériel fémoral afin de monitorer la PAM et les gaz du sang. Une heure après la réalisation du TC expérimental (impact-accélération) ou une heure après l'heure de référence dans le groupe Sham, les animaux étaient placés dans un IRM à 4,7T pour la réalisation d'une carte T_2 anatomique, d'une carte d'ADC et d'une carte de lSO_2. Afin d'étudier la fixation d'un marqueur tissulaire de l'hypoxie, un rat traumatisé a également été étudié par immunomarquage une heure après l'injection de pimonidazole (60 mg/Kg).

2.3 Application de la mesure de la lSO_2 dans un modèle d'ischémie cérébrale

Afin d'explorer les autres champs d'application de la mesure de la lSO_2, cette méthode IRM a été appliquée au modèle d'ischémie cérébrale, exploité au sein de l'équipe 5 (Dr Anaick Moisan et Dr Olivier Detante). Ces manipulations ont été réalisées par Anaick Moisan (thèse Equipe 5 du GIN) avec ma collaboration.

9 rats males Wistar ont été anesthésiés et ventilés mécaniquement. Des cathéters veineux et artériels fémoraux ont été implantés en fémoral pour collecter les gaz du sang et injecter le produit de contraste (P904, 200 µmol/Kg, Guerbet, Roissy, France ; Combidex, AMAG Pharmaceuticals, Inc., MA, USA). Une ischémie focale transitoire a été induite par occlusion intraluminale de l'artère cérébrale moyenne (ACM) droite. Après dissection de l'artère carotide commune, un filament était avancé dans la lumière de la carotide interne droite jusqu'à 5 mm après la base du crane. 5 minutes avant l'occlusion, du pimonidazole (60 mg/Kg, Chemicon International, Temecula, CA, USA) dilué dans du serum salé était injecté par voie intraveineuse. Après 30 minutes d'occlusion, la session IRM débutait avec mesure de l'ADC et de la lSO_2. Les

rats étaient ensuite sacrifiés après deux heures d'occlusion de l'ACM. Après sacrifice le cerveau était rapidement extrait, congelé à -40℃ avec de l'isopentane et stocké à -80℃ (Figure 46) afin d'e ffectuer l'analyse immunohistochimique (fixation du pimonidazole).

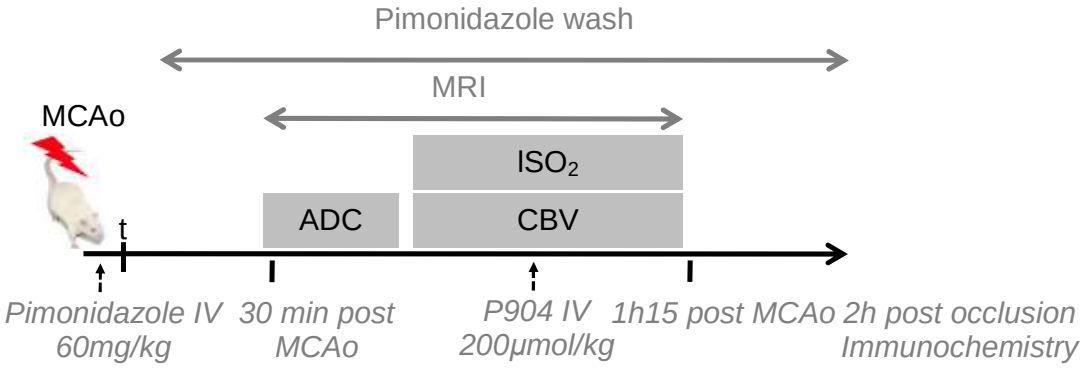


Figure 46 : Chronogramme de la manipulation ischémie cérébrale

3. Résultats

3.1 Influence de la FiO_2 sur la mesure IRM de lSO_2

Nous avons d'abord évalué l'impact de variations de la fraction inspirée d'oxygène (FiO_2), en utilisant 3 séries d'expériences chez des rats sains ventilés mécaniquement sous anesthésie générale (isoflurane 2%). Les variations de la FiO_2 n'ont pas eu d'impact sur la $PaCO_2$, le taux d'hémoglobine ou la pression artérielle moyenne dans les 3 séries d'expérimentations (Figure 47).

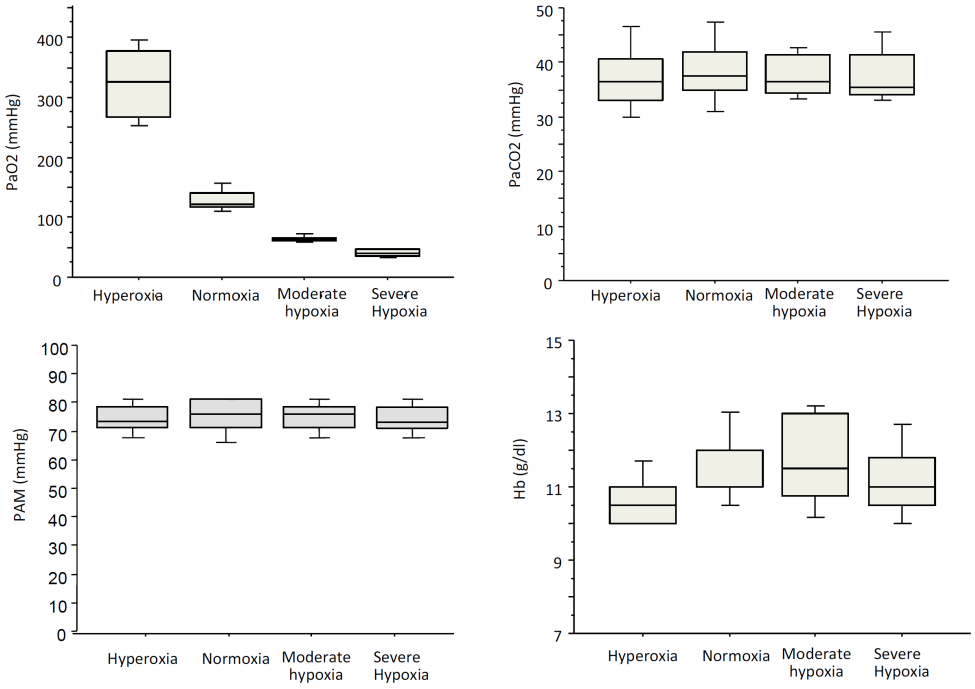


Figure 47 : PaO_2, $PaCO_2$, Hémoglobine (Hb) et préssion artérielle moyenne (MAP) pour les différents challenges d'oxygénation.

Dans la première série d'expérience, nous avons monitoré les gaz du sang de la veine fémorale, l'artère fémorale et du sinus longitudinal supérieur chez 11 rats Wistar mâles sains ventilés mécaniquement sous anesthésie générale soumis à 2 conditions différentes d'oxygénation parmi l'hyperoxie, la normoxie, l'hypoxie modérée et l'hypoxie sévère. Une relation linéaire (R^2>0,95, p<0.01) a pu être retrouvée entre la SvO_2 (SO_2 dans la veine fémorale) et la SsO_2 (SO_2 dans le sinus longitudinal supérieur) (Figure 48).

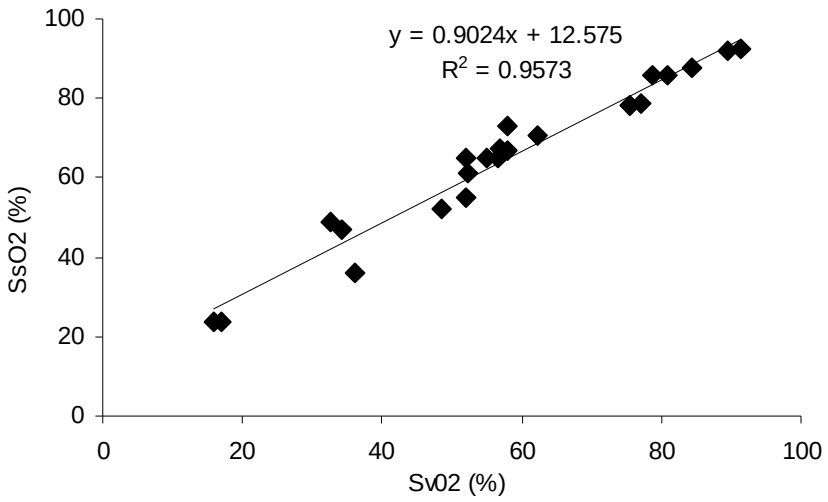


Figure 48: Corrélation entre les valeurs de SvO_2 et les valeurs de SsO_2 mesurées pour les différentes conditions d'oxygénation.

Dans la deuxième série d'expérimentations, les gaz du sang artériel et veineux fémoraux ont été monitorés en mëme temps que la $PtiO_2$, en utilisant une fibre optique implantée dans le striatum de 5 rats Wistar mâles sains anesthésiés et ventilés mécaniquement. Les rats étaient soumis successivement aux mêmes niveaux d'oxygénation que dans la première série d'expérience, selon la même temporalité. La $PtiO_2$ était corrélée linéairement ($R^2>0,85$, $p<0.01$) avec la valeur estimée de la SsO_2 par la formule obtenue dans l'expérience 1 (Figure 49).

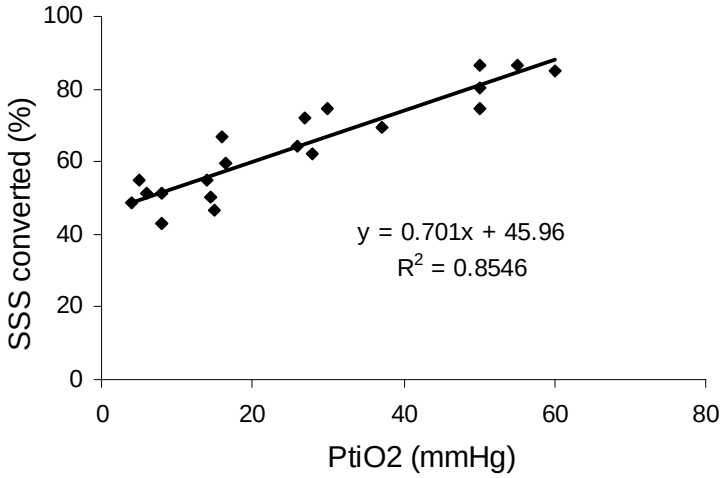


Figure 49 : Corrélation entre SsO_2 estimée (*SSS converted*) et $PtiO_2$ pour les différents challenges d'oxygénation.

Dans la troisième série d'expériences, la ISO_2 a été mesurée par IRM (4,7 T) chez 17 rats sains, anesthésiés et ventilés mécaniquement, soumis aux mêmes conditions de FiO_2 que dans l'expérience 1 selon le même protocole (2 conditions par rat). Ainsi une carte T_2, une carte T_2* ainsi qu'une carte de VSC étaient obtenues pour d'obtenir une carte de ISO_2 pour chaque condition d'oxygénation (2 conditions par rat) (Figure 50).

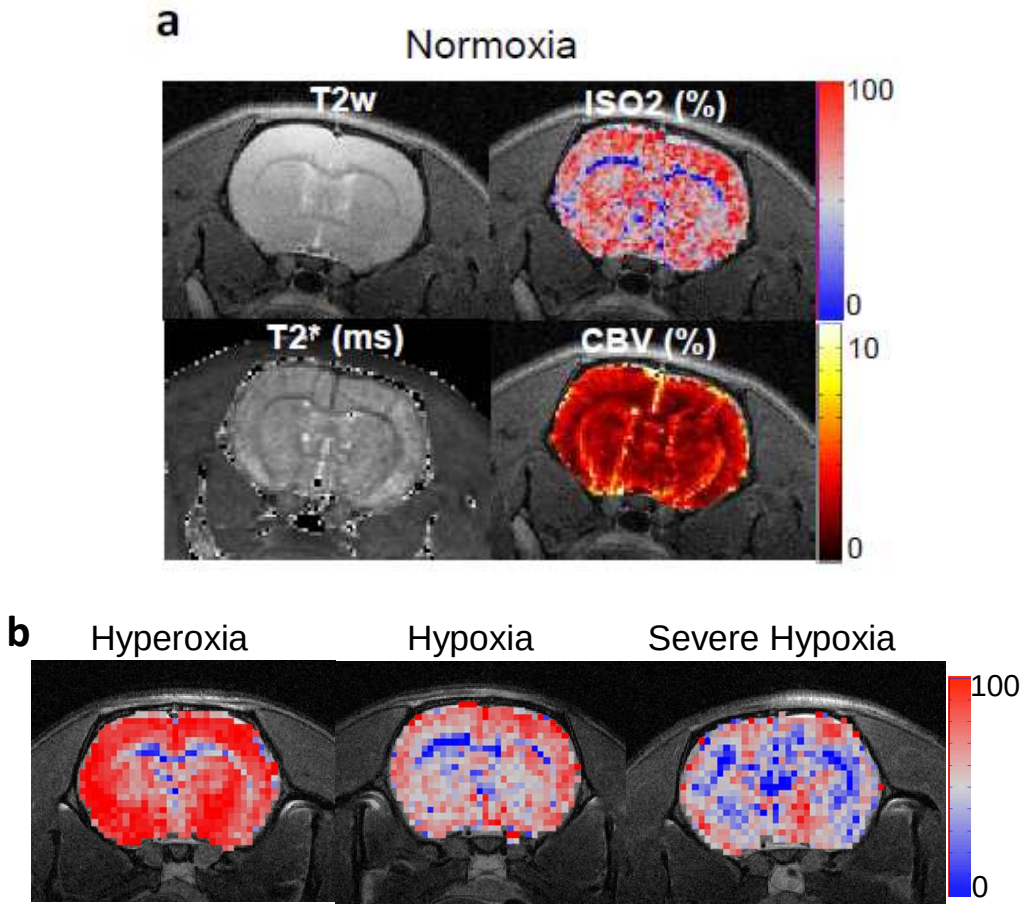


Figure 50 : a. Carte de T_2, T_2*, VSC (*CBV*) et ISO_2 pour un rat sain en normoxie. b. Cartes de ISO_2 obtenues pour les 3 autres conditions de FiO_2.

Les gaz du sang artériels et veineux fémoraux ont été également prélevés. Les données de SvO_2 fémorale obtenues dans cette expérience ont été converties en valeurs de SsO_2 grâce à la formule trouvée dans l'expérience 1. Les ISO_2 mesurées ont été bien corrélées avec les mesures de SsO_2 calculées au sein de la substance grise (R^2=0.84, $p<0.01$), la corrélation était moins bonne dans

la substance blanche (R^2=0.63, $p<0.01$) (Figure 51). L'analyse par bland-Altman (Figure 52) indiquait une ISO_2 sur-estimée dans l'hypoxie sévère et sous estimée dans l'hyperoxie.

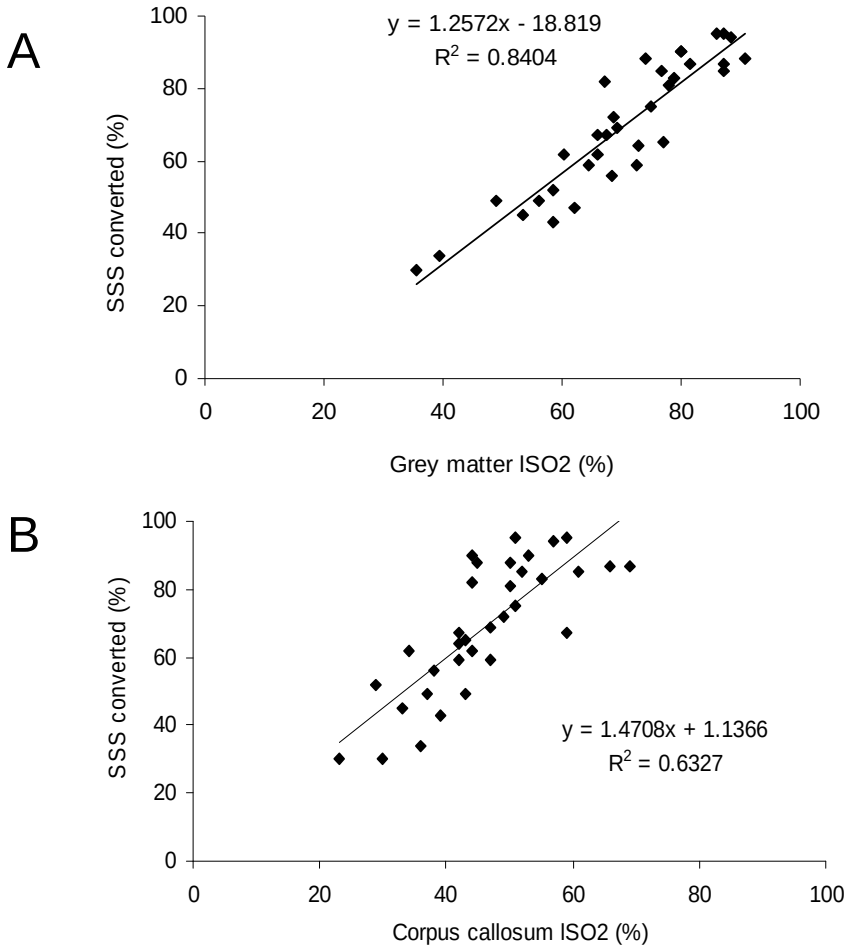


Figure 51: Corrélations entre ISO_2 et SsO2 calculée (*SSS converted*) dans la substance grise (A, *grey matter*) et dans le corps calleux (B, *corpus callosum*).

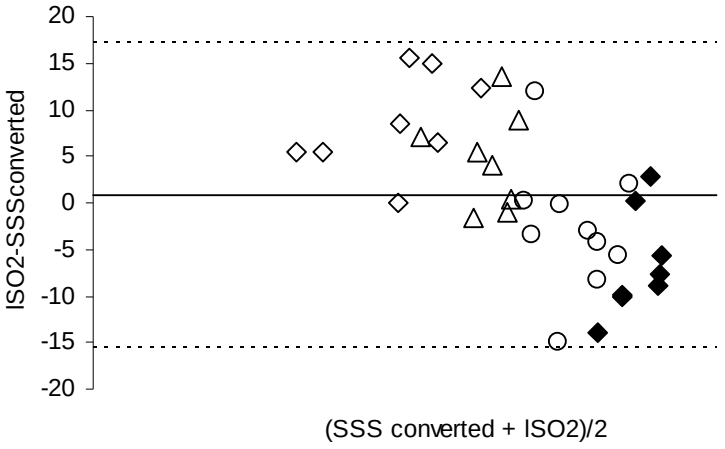


Figure 52 : Représentation de Bland-Altman de la relation entre SsO_2 calculée (*SSS converted*) et lSO_2 dans la substance grise

Nous n'avons pas observé de modifications de VSC selon les conditions d'oxygénation (Figure 53).

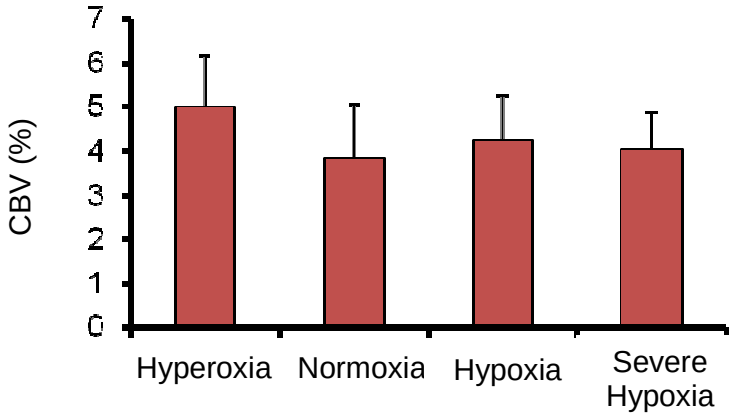


Figure 53 : CBV en % selon la condition d'oxygénation étudiée.

3.2 Application dans le modèle de TC expérimental

Les rats dans les 2 groupes (Sham et TC) ont eu les mêmes paramètres physiologiques (données non montrées) concernant la PaO_2, la $PaCO_2$, l'hémoglobine et les niveaux de PAM. L'ADC moyen dans le groupe de rats traumatisés (0,79 x 10^{-3} mm²/sec ± 0,07 x 10^{-3} mm²/sec) a été inférieur au groupe témoin (0,91 x 10^{-3} mm²/sec ± 0,05 x 10^{-3} mm²/sec), traduisant la

présence d'un œdème cérébral cellulaire. La ISO_2 globale était inférieure une après le TC dans le groupe TC-Placebo (63% ± 5%) comparé au groupe témoin (76% ± 6%, Figure 54).

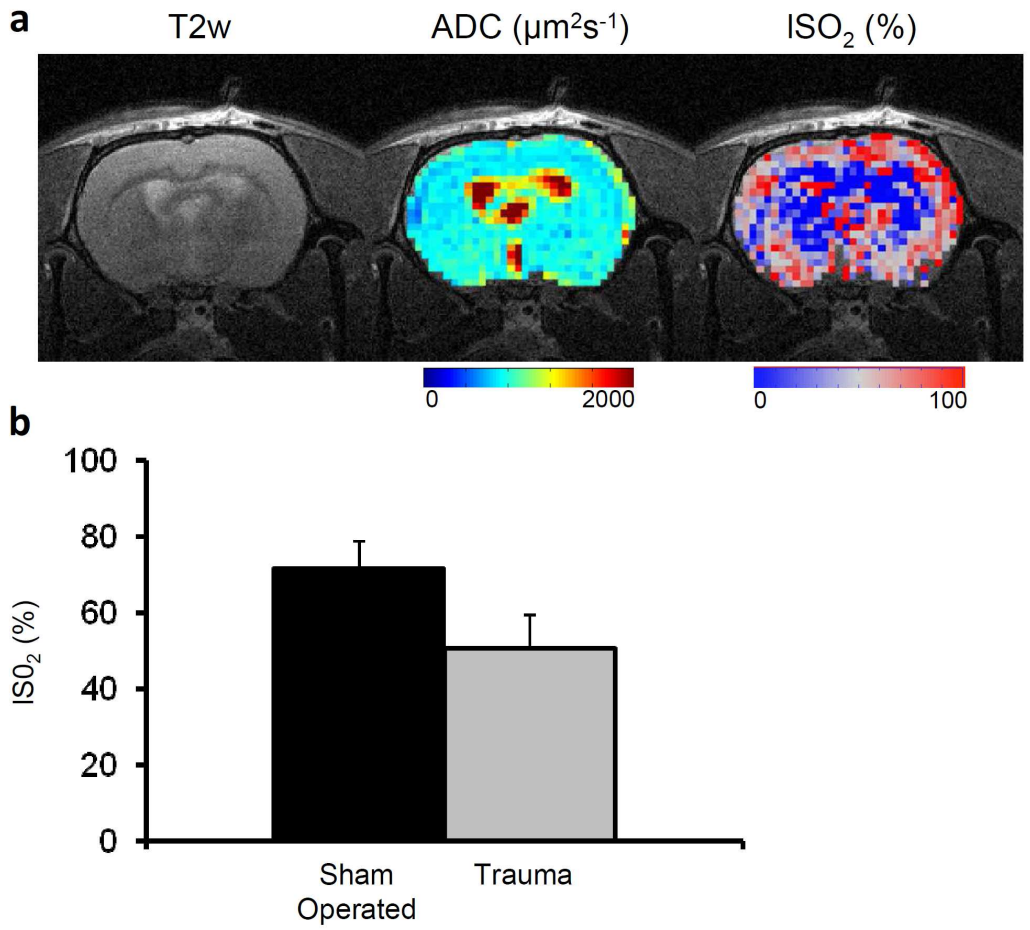


Figure 54 : a : Image anatomique (T_2), carte d'ADC et cartographie de ISO_2 chez un rat traumatisé. b: ISO_2 mesurée selon les groupes.

La mesure IRM de la ISO_2 chez des rats traumatisés a donc montré une hypoxie cérébrale post-traumatique. Cette méthode est plus sensible que des méthodes histologiques comme l'injection de pimonidazole compte tenu de l'hypoxie modérée observée (63% de ISO_2 en moyenne). Pour attester de l'absence d'hypoxie profonde (PO_2 < 10 mmHg) post-traumatique dans notre modèle, un rat traumatisé a reçu une injection de pimonidazole (60 mg/Kg, Chemicon International, Temecula, CA, USA) juste après le TC afin d'étudier sa fixation post-traumatique une heure après le TC par méthode

immunohistochimique. Aucune fixation n'a été retrouvée en histologie contrairement au modèle d'ischémie cérébrale réalisé par l'équipe 5 (Figure 55). La détermination de la lSO_2 semble donc être une méthode de mesure pertinente dans notre modèle expérimental de TC.

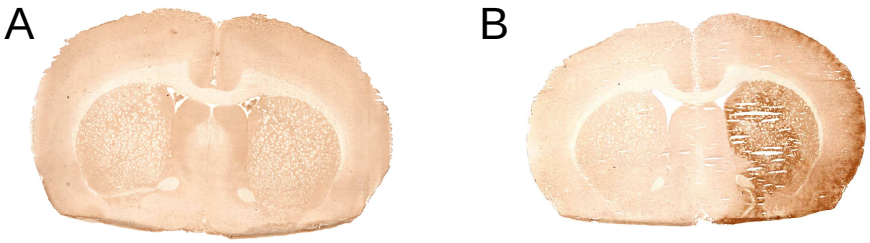


Figure 55 : A : Absence de fixation du pimonidazole dans notre modèle de TC par impact-accélération. B : Fixation du pimonidazole dans un modèle d'AVC dans les zones de PO_2 <10 mmHg

3.3 Application dans un modèle d'ischémie cérébrale

La comparaison des cartes de lSO_2 et des coupes histologiques marquées au pimonidazole montre une bonne colocalisation entre les régions d'hypoxie en IRM (lSO_2<40%) et les régions marquées au pimonidazole (Figure 56). Le seuil de lSO_2 a été fixé d'après des études montrant qu'en dessous d'une saturation sanguine en oxygène d'environ 40%, l'apport en oxygène n'était plus suffisant pour les cellules et pouvait induire une nécrose tissulaire (Kurth, Levy et al. 2002; Merritt, Bevilacqua et al. 2003). L'analyse des neuf rats a montré une corrélation significative entre les surfaces d'hypoxie analysées par IRM (lSO2<40%) et celles marquées par la pimonidazole (coefficient de corrélation de Pearson r = 0,911, p = 0,001).

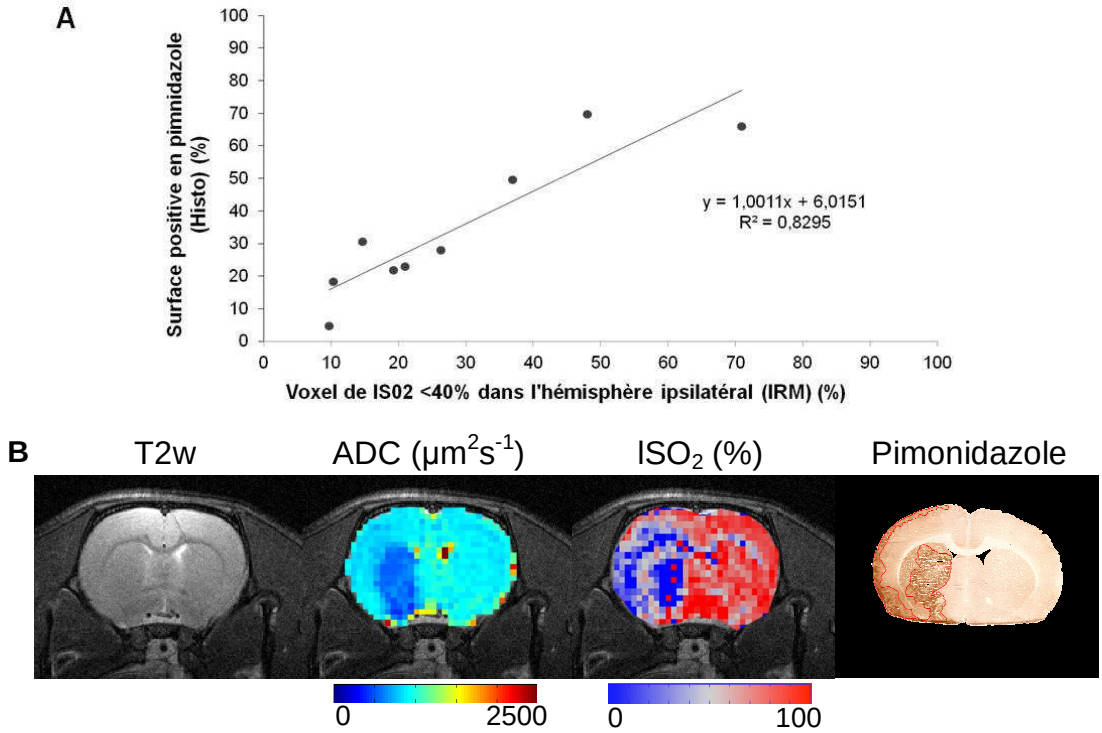


Figure 56 : A : Corrélation entre la surface fixant le pimonidazole et la surface avec une ISO_2<40% en IRM. B : Cartographies obtenues en IRM et coupe histologique correspondante.

5. Discussion

Dans notre étude, la mesure de la ISO_2 par IRM a été corrélée à la mesure de la saturation en oxygène du sinus longitudinal supérieur pour différentes conditions de FiO_2 chez des rats sains intubés et ventilés sous anesthésie générale. Cette méthodologie s'est avérée également capable de mesurer l'hypoxie cérébrale dans un contexte post-traumatique comme dans l'ischémie cérébrale. Ces résultats confortent l'utilisation de cette technique IRM pour explorer le fonctionnement cérébral normal et pathologique.

Comme toutes les autres techniques IRM de mesure de la ISO_2, cette méthode possède des approximations potentielles. La première d'entre elles est constituée par l'hématocrite capillaire. Dans le calcul présenté ici de la ISO_2, l'hématocrite fixé a été l'hémotocrite capillaire, plus faible que l'hématocrite veineux (Tropres, Lamalle et al. 2004; Christen, Lemasson et al. 2011). Cependant en pathologie, cet hématocrite capillaire est probablement perturbé

par des phénomènes microvasculaires comme la compression des capillaires par l'œdème cérébral post-traumatique (Menon, Coles et al. 2004). Ainsi, en pathologie, notre méthode de calcul peut s'avérer prise en défaut pas les troubles microcirculatoires. L'autre approximation pourrait provenir du modèle mathématique utilisé. Lorsque les caractéristiques du tissu diffèrent de l'hypothèse du modèle, cette méthode de calcul peut être mise en défaut. C'est probablement le cas au niveau du corps calleux. La corrélation, en effet, retrouvée au sein du corps calleux a été nettement moins bonne qu'au niveau de la substance grise. Les contraintes géométriques du corps calleux comme la nécessité d'une excellente résolution spatiale peuvent être à l'origine de ces mauvais résultats (Christen, Lemasson et al. 2011). Par ailleurs, une susceptibilité magnétique particulière du corps calleux liée au contenu en myéline (Duyn, van Gelderen et al. 2007) ou en métaux (Haacke, Cheng et al. 2005) pourrait expliquer un comportement différent de la substance blance par rapport à la substance grise.

Les valeurs de lSO_2 retrouvées dans notre étude demeurent plus élevées que d'autres valeurs publiées chez le rat sain en normoxie : 76% ± 6% dans notre étude *vs* 58% ± 1% (An, Liu et al. 2009). Le maintien de l'anesthésie générale par Isoflurane à 2% est susceptible d'expliquer cette différence (1,5% dans l'autre étude) par une diminution du métabolisme cérébral plus grande par une profondeur d'anesthésie plus importante.

Pour valider notre méthodologie IRM, nous avons utilisé des mesures de saturation veineuse. Une comparaison avec une autre méthode de type NIRS ou TEP aurait été préférable. Cependant, la TEP nécessite la manipulation de traceurs radioactifs à demi-vie très courte non générés localement et nous ne possèdons pas de NIRS animale. Nous avons cependant montré une bonne corrélation entre la saturation veineuse en oxygène du sinus longitudinal supérieur et la lSO_2 mesurée en IRM, suggèrant que la mesure de la lSO_2 est très proche de la saturation veineuse locale, permettant d'établir des cartes d'extraction d'oxygène (OEF= 1-lSO_2) et de $CMRO_2$, en multipliant l'OEF par le DSC.

Dans notre modèle de TC expérimental, l'utilisation de la mesure de la lSO_2 a permis de mettre en évidence des zones d'hypoxie cérébrale avec une lSO_2 globale comparable à un rat sain en hypoxie modérée. Des zones

hypoxiques profondes (PO_2 < 10 mmHg) n'ont par ailleurs pas été retrouvées par l'immunomarquage au pimonidazole. Ces résultats suggèrent donc des conséquences hypoxiques du TC expérimental au niveau du parenchyme cérébral sans réelle nécrose tissulaire (PO_2 < 10 mmHg). Des mesures de $PtiO_2$ réalisées dans l'étude 2 confirment ce résultat retrouvant au sein du cortex une diminution de la $PtiO_2$ autour de 15 mmHg pour une valeur normale autour de 30 mmHg (Figure 4, Etude 2). Ce résultat confirme l'intérêt de la mesure IRM de la lSO_2 dans notre modèle d'œdème cérébral diffus post-traumatique et permet d'envisager l'utilisation de cette technique pour évaluer l'effet de thérapeutiques sur l'oxygénation cérébrale.

Dans le modèle d'ischémie cérébrale, les zones hypoxiques avec une lSO_2 inférieure à 40% ont bien été corrélées avec les zones fixant le pimonidazole. Ces zones correspondent à des zones cellulaires incompatibles avec la survie (Kurth, Levy et al. 2002; Merritt, Bevilacqua et al. 2003) évoluant vers la nécrose tissulaire. La mesure IRM de la lSO_2 pourrait permettre ainsi d'évaluer le potentiel de récupération de la zone atteinte par l'ischémie cérébrale par la soustraction de la surface de cerveau avec une lSO_2<40% de la surface de la zone ischémique en ADC par exemple. La caractérisation de la zone de pénombre ischémique ainsi délimitée constitue un enjeu pronostic important de la pathologie ischémique, dont la meilleure estimation actuelle est effectuée par le mismatch ADC-Perfusion (Siemonsen, Fitting et al. 2012).

Enfin, la transposition de cette technique vers l'homme est une préoccupation constante de notre équipe (*travail de thèse en cours de Julien Bouvier*) afin de la rendre accessible pour l'étude de l'oxygénation cérébrale notamment en pathologie.

Etude 3

Etude de l'oxygénation cérébrale après un traitement par érythopoïétine dans un modèle de traumatisme crânien diffus.

Dans cette étude, nous avons utilisé un traitement par érythropoïétine à la dose de 5000 UI/Kg, injecté 30 minutes dans notre modèle de TC par impact-accélération, afin d'évaluer son effet sur l'oxygénation cérébrale post-traumatique et ses différents déterminants.

Pour cela, nous avons évalué l'effet de l'Epo sur la mesure de la lSO_2 par IRM ainsi que sur la mesure de la $PtiO_2$ par fibre optique (capteur oxylite) deux heures après le traumatisme. Une évaluation de l'œdème cérébral était également effectuée par la mesure du coefficient apparent de diffusion de l'eau en IRM de diffusion (ADC). La macrocirculation cérébrale était également évaluée par la mesure du temps de transit moyen (TTM) et du volume sanguin cérébral (BVf) par la méthode de 1er passage d'un agent de contraste IRM. La microcirculation était, quant à elle, évaluée par l'étude des capillaires vasculaires cérébraux en microscopie électronique. Cette étude a fait l'objet d'une publication acceptée dans *Critical Care Medicine*.

Changes in brain tissue oxygenation after treatment of diffuse traumatic brain injury by erythropoietin

Pierre BOUZAT, M.D. [1,2,3]
Anne MILLET, M.D. [1,2,4]
Yvonnick BOUE, M.D. [1,2,3]
Karin PERNET-GALLAY, Ph.D. [1,2]
Thibaut TROUVE-BUISSON, M.D. [1,2,3]
Lucie GAIDE-CHEVRONNAY, M.D. [1,2,3]
Emmanuel L. BARBIER, Ph.D. [1,2]
Jean-Francois PAYEN, M.D., Ph.D. [1,2,3]

[1] INSERM, U836, Grenoble, F-38042, France
[2] Université Joseph Fourier, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, F-38042, France
[3] Pôle d'Anesthésie-Réanimation, Hôpital Michallon, Grenoble, F-38043 France
[4] Département de Réanimation Pédiatrique, Hôpital Couple-Enfant, Grenoble, F-38043, France

Correspondence: Dr J-F PAYEN, Grenoble Institut des Neurosciences, INSERM U836/Equipe 5. Université Joseph Fourier, Site Santé La Tronche. BP 170. Grenoble Cedex 9. 38042 France. Tel 33 4 56 52 05 89. Fax 33 4 56 52 05 98. Email: jfpayen@ujf-grenoble.fr

Received from INSERM U836 and Université Joseph Fourier, Grenoble, France

Running title: EPO and brain oxygenation after TBI

Keywords: erythropoietin; traumatic brain injury; brain edema; brain oxygenation; MRI; MR diffusion-weighted imaging; BOLD

Abstract

Objective. To investigate the effects of recombinant human erythropoietin (rhEPO) on brain oxygenation in a model of diffuse traumatic brain injury (TBI).

Design. Adult male Wistar rats

Setting. Neurosciences and physiology laboratories

Interventions. Thirty minutes after diffuse TBI (impact-acceleration model), rats were intravenously administered with either a saline solution (TBI-saline) or rhEPO (5,000 IU/kg; TBI-EPO). A third group received no TBI insult (sham-operated).

Measurements and main results. Three series of experiments were conducted 2h (H2) after TBI to investigate: (i) the effect of rhEPO on brain edema using diffusion-weighted MRI and measurements of apparent diffusion coefficient (n = 11 rats per group); local brain oxygen saturation (lSO_2), mean transit time (MTT) and blood volume fraction (BVf) were subsequently measured using a multiparametric MR-based approach to estimate brain oxygenation and brain perfusion in the neocortex and caudoputamen; (ii) the effect of rhEPO on brain tissue PO_2 ($PbtO_2$) in similar experiments (n = 5 rats per group); and (iii) the cortical ultrastructural changes after treatment (n = 1 rat per group). Compared to the sham-operated group, TBI-saline rats showed a significant decrease in lSO_2 and in $PbtO_2$ alongside brain edema formation and microvascular lumen collapse at H2. Treatment with rhEPO reversed all of these TBI-induced changes. Brain perfusion (MTT and BVf) was comparable between the three groups of animals.

Conclusion. Our findings indicate that brain hypoxia can be related to microcirculatory derangements and cell edema without evidence of brain ischemia. These changes were reversed with post-traumatic administration of rhEPO, thus offering new perspectives in the use of this drug in brain injury.

Introduction

Patients with severe traumatic brain injury (TBI) are treated by strict avoidance of conditions known to aggravate primary brain injury, such as arterial hypotension, hypertension, systemic hypoxia, hypercapnia or severe hypocapnia. The prevention of elevated intracranial pressure (ICP) and the maintenance of an appropriate cerebral perfusion pressure (CPP) are widely applied measures to minimize ischemic insult (1). However, recent studies have demonstrated that episodes of brain hypoxia as assessed by brain tissue PO_2 ($PbtO_2$) probes are common despite optimization of CPP, and are independently associated with poorer patient outcome (2,3). Aggressive treatment of low $PbtO_2$ was associated with improved outcome compared to standard ICP/CPP-directed therapy in cohort studies of severely head-injured patients (4,5). In addition, $PbtO_2$ could be primarily influenced by factors governing oxygen diffusion rather than total oxygen delivery (6). Collectively these findings suggest that brain tissue hypoxia, as reflected by low $PbtO_2$, cannot be viewed as a simple consequence of macrovascular ischemic insult, but may reflect a more complex interaction between the injured tissue and its microvascular environment.

The transportation of oxygen into the brain tissue is driven by a diffusion gradient in oxygen concentration between blood and cell. Neurovascular coupling, the range of mechanisms that adjust arteriolar tone according to local metabolic needs, represents the basis of our current understanding on how this is achieved. It is also clear that the spatial organization of the vascular system is a key factor in maintaining effective oxygen transportation (7,8). In injured brain, the balance between oxygen demand and supply can be disrupted as a result of increased brain metabolism, reduction in cerebral blood flow, and/or disturbances in the microcirculation. Ultrastructural studies of brain microvessels after traumatic contusions have reported the occurrence of endothelial edema, microvascular collapse and perivascular swelling (9,10). The compression of microvessels by swollen glial-foot processes and/or their obstruction by microthromboses have been found responsible for peri-contusional ischemia (11-13). In TBI patients, such microvascular damage

accounted for the inability of pericontusional tissue to increase the oxygen extraction fraction (OEF) in response to moderate hypocapnia-induced hypoperfusion (14). Therefore, despite no evidence of frank cerebral ischemia, microvascular ischemia might develop after traumatic contusion, and is characterized by increased barriers to the diffusion of oxygen that reduce cellular oxygen delivery (14). Whether such relations among microcirculation disturbances, tissue edema and brain hypoxia exist without traumatic contusion is unknown.

Erythropoietin is a multifunctional agent with tissue-protecting antiapoptotic, anti-inflammatory, antioxidative and neurotrophic properties (15,16). Posttraumatic administration of recombinant human erythropoietin (rhEPO) was found to induce a significant reduction of inflammation and cell apoptosis, together with improved functional recovery after focal TBI in mice (17). Improved cognitive function was found in rats treated with erythropoietin-mimetic peptide even after mild TBI (18). Using the impact-acceleration model to induce diffuse TBI in rats, we found that rhEPO and carbamylated erythropoietin (CEPO), a modified erythropoietin lacking erythropoietic activity, blocked the development of posttraumatic cellular edema as early as 1 hr after the insult (19,20). In addition to its direct effects on neural cells, rhEPO may improve brain perfusion by acting on endothelial growth as well as on cerebral vasculature through an alteration in nitric oxide production (21,22). These findings prompted us to study the acute effects of rhEPO on brain oxygenation in a rat model of posttraumatic diffuse brain edema using a multiparametric MR-based approach to map both brain edema and oxygenation. We hypothesized in this study that the rhEPO-induced changes in brain edema and/or microvascular environment would in turn improve brain oxygenation after trauma.

Materials and methods

Adult male Wistar rats (350-450g) were studied in three series of experiments. In the first series of experiments, we investigated the effects of rhEPO on both posttraumatic brain edema and brain oxygenation. We used diffusion-weighted MR imaging both prior to and 2 h (H2) after TBI, thus each rat (n = 11 per group) acted as its own control. Brain oxygenation and brain perfusion were subsequently measured using multiparametric MRI measurements at H2 post-injury. Rats were randomly assigned to one of three groups: the TBI-saline group received saline and the TBI-EPO group rhEPO 30 min after the TBI insult. The third, sham-operated group received no TBI insult, and was equally divided to receive either saline or rhEPO.

In the second series of experiments, brain tissue PO_2 ($PbtO_2$) was assessed at H2 using a $PbtO_2$ probe inserted into the cortex otherwise following the same experimental protocol (n = 5 rats per group). In the third series of experiments following the same experimental protocol, ultrastructural analysis was conducted at H2 with one rat per group.

Experimental protocol

The study design was approved by the local Internal Evaluation Committee for Animal Welfare and Rights. Experiments were performed in accordance with French Government guidelines (licenses 380819 and A3851610008). The experimental protocol was similar to that described previously (19). Anesthesia was induced and maintained with isoflurane (expired fraction of 2%) throughout the study period. After tracheal intubation, rats were mechanically ventilated with 60% air–40% oxygen using a rodent ventilator (SAR-830/P, CWE, Ardmore, PA, USA). Rectal temperature was maintained at 36.5±0.5℃. Catheters were inserted i nto the femoral artery and vein to allow the monitoring of mean arterial blood pressure (MABP) and the delivery of drugs. Blood gases (PaO_2 and $PaCO_2$), arterial oxygen saturation of hemoglobin (SaO_2), arterial pH (pHa), and hemoglobin content were determined from arterial blood samples of less than 0.1mL (ABL 510, Radiometer, Copenhagen, Denmark). Exclusion criteria were the persistence

for at least 10 min of out-of-range values for the following physiological parameters: MABP <60 mm Hg, PaO_2 <100 mm Hg, $PaCO_2$ <30 mm Hg or >45 mm Hg, and hemoglobin content <80 g/L. Injury was induced by dropping a 500-g mass through a vertical cylinder from a height of 1.5m onto a metallic disc glued to the skull, according to the impact-acceleration model (23). The reference time (H0) corresponded to the moment of impact (TBI-EPO and TBI-saline) or to an equivalent time (sham-operated). At 30 min after H0, rats were intravenously administered either 0.5 mL of an isotonic saline solution (TBI-saline) or 5,000 IU/kg of Epoetin alfa (Eprex®, Janssen-Cilag Division Ortho Biotech, Issy-les-Moulineaux, France) diluted in 0.5 ml of saline solution (TBI-EPO). The sham-operated rats were similarly treated, but were not subjected to TBI.

MRI imaging

MRI experiments were performed at B_0=4.7T, in a horizontal bore magnet (Biospec 47/40 USR AV III, Bruker BioSpin, Wissembourg, France) equipped with actively shielded gradient coils generating gradients of up to 660 mT/m in 120 µs. We used a volume and surface cross coil configuration. The protocol for MRI acquisition included successive sequences to assess brain edema using diffusion-weighted imaging, local brain oxygen saturation using a multiparametric quantitative blood oxygenation level-dependent (BOLD) approach (24), cerebral perfusion using a dynamic susceptibility approach allowing the determination of mean transit time (MTT) of an intravenously injected contrast agent (25), and blood volume fraction (BVf) using a steady-state approach (26) (Supplemental Digital Content 1).

MRI analysis

* BVf

BVf was estimated using the previously described steady-state approach (26):

$$BVf = \frac{3}{4.\pi.\gamma.\Delta_{\chi_{USPIO}}.B_0}.\left(\frac{1}{T_{2\,after}^{*}} - \frac{1}{T_{2\,before}^{*}}\right) \qquad \textit{(Eq.1)}$$

where the change in susceptibility after injection of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide (USPIO), $\Delta\square_{USPIO}$, is equal to $0.28.10^{-6}$ ppm (27). $T_2{*}_{before}$ and $T_2{*}_{after}$ correspond to the transverse relaxation time obtained via a non-linear fit of a monoexponential decay, from the 2D multiple gradient echo sequence acquired before and after injection of USPIO, respectively. The proton gyromagnetic ratio, γ, is equal to $2.67502*10^8$ rad/s/T.

* Tissue lSO_2

Local brain oxygen saturation (lSO_2) maps were obtained using the approach we described previously (24,28). A T_2 map was derived from the data obtained with the 2D multiple spin-echo sequence via a non-linear fit of monoexponential decay. To correct for the macroscopic inhomogeneity of B_0, the 3D multiple gradient-echo was spatially averaged. Thereby, a multiple gradient-echo dataset with a spatial resolution matching that of the T_2 and of the BVf maps was obtained. The following equation was fitted pixelwise to the MR signal decay collected at echo times over 10 ms from the multiple gradient-echo dataset using T_2 and BVf from the corresponding maps (24):

$$s(t) = Cte.\exp(-\frac{1}{T_2}.t - BVf.\gamma.\frac{4}{3}\pi.\Delta_{\chi_0}.Hct.(1 - lSO_2).B_0.t)$$

(Eq.2)

where Δ_{χ_0}, the difference between the magnetic susceptibilities of fully oxygenated and fully deoxygenated hemoglobin is equal to $0.264*10^{-6}$ ppm (29), Cte is a constant and Hct, the microvascular hematocrit, is equal to 0.357 (24).

Mean transit time (MTT) was calculated from the calculation of $\Delta R_2^*(t)$:

$$\Delta R_2^*(t) = \frac{1}{TE} ln\left(\frac{S(t)}{S_0}\right)$$

(Eq.3)

where S(t) refers to the signal, TE to the echo-planar imaging (EPI) echo time, and S_0 to the baseline amplitude before injection of contrast agent. The gamma-variate function:

$$c(t) = K(t-t_0)^{\alpha} e^{(-\frac{t-t_0}{\beta})} \quad \textit{(Eq.4)}$$

was then fitted to ΔR_2^* (t) using a non-linear Levenberg-Marquardt algorithm. □□, t_0 and K are the parameters, thereby adjusted. MTT was computed pixelwise as the first moment of the gamma-variate.

For each rat, four regions of interest, right and left parietal neocortex and right and left caudoputamen, were manually drawn on the T_2-weighted images and copied onto the apparent diffusion coefficient (ADC), lSO_2, BVf, and MTT images. The values of the 4 regions of interest were averaged (Fig.1)

Brain tissue PO_2 measurement

Immediately after the insult (or equivalent time), a $PbtO_2$ probe was stereotactically inserted (-1 mm from bregma, 3 mm from the sagittal suture, 3 mm depth from the skull) (Oxylite, Oxford Optronics, Oxford, UK). This insertion site corresponded to the cortical region of interest explored by MRI. After 1-hr stabilization, the inspired oxygen fraction was transiently increased to test the functioning of the $PbtO_2$ probe (60 ± 10 mmHg with 100% inspired oxygen). $PbtO_2$ measurements were then achieved at H2 under stable conditions with respect to PaO_2, $PaCO_2$, hemoglobin, temperature and arterial blood pressure.

Ultrastructural analysis

In the third series of experiments, rats were sacrificed by decapitation at H2 post-injury. Brains were rapidly excised and cortex samples (n = 3 per rat) fixed in 2.5% glutaraldehyde (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4) for 24 h at room temperature. Samples were then postfixed in 1% osmium tetroxide (0.1 M cacodylate, pH 7.2) for 1 h at 4℃, and stained wit h 1% uranyl acetate (pH 4) in water for 1 h at 4℃ and dehydrated through graded alcohol concentrations before being embedded in Epoxy Embedding Medium (Fluka, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Cortex brain ultrathin sections (60 nm-thickness) were stained with 5% uranile acetate and 0.4% lead citrate before being observed under a transmission electron microscope at 80 kV (Jeol 1200 EX, JEOL Ltd, Tokyo, Japan). The analysis was performed on 3 cortex samples per rat and at least 15 images of capillary cross sections were acquired for each sample. Images were acquired with a digital camera (Veleta, SIS, Olympus, Munster, Germany).

Statistical analysis

Data were expressed as mean ± SD. After receiving either saline or rhEPO, sham-operated rats were pooled into a single group since no statistically significant differences were found between the initial two groups with regards to treatment. The nonparametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were performed for continuous variables (StatView SE program, SAS Institute, Cary, NC, USA). Bonferroni's correction was applied for multiple comparisons where appropriate. Statistical significance was declared when $p < 0.05$.

Results

In the first series of experiments, no differences in physiological parameters were found between the 3 groups of animals regarding MABP, PaO_2, $PaCO_2$, arterial pH, temperature and hemoglobin content (Table 1). Averaged ADC of the four regions of interest was significantly reduced at H2 in the TBI-saline group in comparison with their baseline values: ΔADC = -11 ± 3% (ΔADC = ADC at H2 – ADC at H0 / ADC at H0) ($p < 0.01$). Conversely, no significant ADC changes were found for TBI-EPO and sham-operated groups at H2: -4 ± 9% and 2 ± 4%, respectively ($p < 0.05$ *versus* TBI-saline) (Fig. 2A). Meanwhile, ISO_2 values obtained at H2 were significantly lower in the TBI-saline group by comparison with the two other groups: 71 ± 8% *versus* 79 ± 6% and 79 ± 10% in the TBI-EPO and sham-operated groups, respectively ($p < 0.05$ *versus* TBI-saline) (Fig. 2B). BVf values of the four regions of interest were no different between the three groups: 4.3 ± 0.9 ml/100 ml, 4.8 ± 1.2 ml/100 ml, and 5.0 ± 1.2 ml/100 ml of brain tissue in the TBI-saline, TBI-EPO and sham-operated groups, respectively (Fig. 3A). Similarly, MTT values did not differ between the three groups: 1.1 ± 0.3 s, 1.1 ± 0.3 s, and 0.9 ± 0.2 s, respectively (Fig. 3B).

In the second series of experiments, $PbtO_2$ measurements at H2 post-injury were lower in the TBI-saline group compared to the two other groups: 16 ± 9 mmHg *vs.* 37 ± 6 mmHg (sham-operated) and 46 ± 13 mmHg (TBI-EPO) ($p<0.01$) (Fig. 4). Again, there were no differences in physiological parameters between the three groups (data not shown).

The third series of experiments, investigating the ultrastructural morphology of the capillaries, showed no change in endothelial cells, tight junctions or basal lamina following the insult compared to sham-operated animal (Fig. 5A-C). However, only 6% (4/65) of the capillaries appeared normal after TBI with over 90% (60/65) being surrounded by edema and appearing electron lucent with electron microscopy. The edema was unambiguously located in the foot processes and cell bodies of astrocytes. It covered more than half of the surface of the capillary and had resulted in a collapsed lumen in 68% of the studied capillaries (44/65). Treatment by rhEPO reversed these

ultrastructural changes: 33% of capillaries had edema covering more than half of the capillary surface and 50% of the capillaries (21/42) appeared normal (Fig. 5D).

Discussion

The results of our study show that posttraumatic brain edema is associated with reduced lSO_2 even when evidence of macrovascular ischemia is lacking. In our rat model, this condition was reversed by post-injury treatment with rhEPO, which improved both brain edema and oxygenation. Our results support the hypothesis that TBI-induced brain hypoxia can be related to microvascular and cellular damage, and that a multifunctional agent such as rhEPO could affect brain oxygenation through its cellular effects. Overall, these findings provide evidence in favor of mechanisms other than a simple perfusion-limited ischemia being responsible for brain tissue hypoxia after TBI.

Local brain oxygen saturation was estimated using a multiparametric quantitative BOLD-MR based approach. This approach was successfully incorporated to allow the quantitative evaluation of hemodynamic parameters such as cerebral blood volume, deoxyhemoglobin concentration and OEF (30), and was applied to map brain oxygenation in models of stroke and brain tumor (31,32). Our MRI protocol combined the multiparametric quantitative BOLD approach with cerebral blood volume measurements during a steady-state approach to estimate local tissue oxygenation within the microvasculature, i.e. arterial and venous capillaries (24). This technique assumes that the difference between T_2 and T_2* is ascribed to the amount of deoxyhemoglobin within the voxel, i.e., Hct x BVf (1-lSO_2). This is not verified in the presence of large B_0 heterogeneities or other sources of magnetic susceptibility changes such as micro-hemorrhages or high myelin content. The accuracy of BVf measurements is also critical since it depends on dosing and characteristics of the contrast agent (33). Nevertheless, we previously found an excellent correlation between lSO_2 and hemoglobin oxygen saturation in the superior sagittal sinus of rats subjected to oxygen challenges (24,32). If cerebral arterial oxygen content is kept constant, lSO_2 measurements might be considered as providing an estimation of brain OEF, with OEF ~ 1-lSO_2, as shown previously (30).

In the TBI-saline group, we found lower lSO_2 measurements, i.e., higher brain tissue OEF, by comparison with the sham-operated group. These findings were confirmed by $PbtO_2$ measurements, which were closely related to the

product of cerebral blood flow (CBF) and arteriovenous oxygen tension difference (6), and inversely correlated with OEF (34). With no evidence of systemic reasons known to reduce arterial oxygen supply, i.e., acute anemia, systemic hypoxia, arterial hypotension, severe hypocapnia, it is reasonable to consider that the high OEF values reflected reduced venous oxygen saturation after trauma. In simple terms, cerebral ischemia results when the delivery of oxygenated blood is insufficient to meet metabolic demand. Initially, cerebral metabolic rate in oxygen ($CMRO_2$) is maintained despite a reduction in CBF through an increase in the OEF. This situation corresponds to the penumbra in stroke (35) as well as in trauma (36,37). However, the concept of traumatic penumbra is consistent with high OEF values, i.e., more than 50%, and concomitant reduction in CBF. In the present study, we found no evidence of such a reduction in CBF as assessed by MTT and BVf, and the lSO_2 values obtained after trauma would have corresponded to OEF of ~30% *versus* ~20% in sham-operated animals (see Fig. 2B). On the other hand, an increase in $CMRO_2$, potentially unmet by inadequate CBF levels, could also be possible through a TBI-induced excitotoxicity. However, such a change in brain metabolism would be expected to have played only a limited role in mechanically ventilated animals maintained under deep anesthesia and normothermia throughout the experiments. In other words, the results in the TBI-saline group would appear to have been due to mechanisms involving the injured tissue and its microvascular environment without any frank ischemia being caused.

Marked disturbances in microcirculatory blood flow have been found early after traumatic contusion due to swollen glial foot processes compressing underlying capillaries (11) and/or to the formation of thrombi in the cerebral microcirculation (13). Additionally, electron microscopy has shown endothelial edema, vacuolization, and pinocytic vesicles, alongside undisrupted tight junctions following TBI (9,10,14). We used the impact-acceleration model that causes early diffuse post-traumatic edema with no disruption to the blood-brain barrier or traumatic contusion (23,38). The presence of this cellular (cytotoxic) type of edema was reflected by the decreased ADC values and by the ultrastructural analysis. Overall, our study indicates that derangements in the microcirculatory blood flow, in part induced by surrounding brain tissue edema,

might have accounted for the differences in brain oxygenation as assessed by lSO_2 and $PbtO_2$ between TBI-saline and sham-operated groups. In addition, the parallel changes in brain oxygenation obtained from PbtO2 and MRI measurements may also provide insights in favor of measuring $PbtO_2$ after diffuse TBI.

We hypothesized that any manipulation to reduce brain edema and concomitant microvascular collapse would improve brain tissue oxygenation. We previously found rhEPO to be a potent anti-edematous agent effective early and durably in this model of diffuse post-traumatic edema (19). In the two TBI-EPO treated groups, ADC measurements (first series of experiments) and electron microscopy (third series of experiments) at H2 provided evidence of a reduction in brain edema. Moreover, changes in ADC paralleled those in lSO_2 (first series of experiments) and $PbtO_2$ levels were similarly affected by rhEPO treatment (second series of experiments) to reach values comparable to those found in sham-operated groups. Collectively, these findings support the beneficial effect of administering rhEPO post-TBI in improving brain tissue oxygenation with no concomitant systemic changes in blood oxygen supply, i.e., blood pressure, PaO_2, and hemoglobin content. However, the exact mechanism by which rhEPO changes post-traumatic brain tissue oxygenation remains unclear. A straightforward anti-edematous effect as obtained with osmotic agents is unlikely to be the unique mechanism. Indeed, the use of those agents to reduce cellular edema yielded inconsistent results regarding their effects on brain oxygenation (39-41). The effects of rhEPO are more likely mediated through a combined action on edematous cells surrounding the capillaries and microvasculature. We have previously proposed that inhibition of the mitogen-activated protein kinase extracellular-regulated kinase (ERK-1/-2) with rhEPO may contribute to preventing the development of post-traumatic brain edema (38). Concordantly, inhibition of ERK-1/-2 was also shown to diminish cell swelling induced by oxidative stress (42), and block manganese-induced increase in aquaporin-4 protein expression (43). In addition, there is some evidence that the binding of EPO to its receptor on endothelial cells leads to phosphorylation of the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway (44), that causes endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and subsequent cerebral vasodilation (22). Whatever the mechanism involved, the resulting

effect of rhEPO treatment after TBI appears to allow the rapid redistribution of capillary flow by reopening collapsed capillaries. According to recent modeling of brain oxygen extraction capacity, such a result would be expected to increase tissue efficacy to utilize oxygen (8).

There are some limitations in this study. Firstly, we assessed brain oxygenation 2 h post-trauma only. Whether these beneficial effects of rhEPO can be sustained for several hours after trauma deserves further investigation. Secondly, we obtained both PbtO2 and lSO_2 values ~10% higher than those found in other studies (31,32,45). The anesthetic agent used in the present study, isoflurane, known to increase CBF in a dose-dependent manner irrespective of brain metabolism, may be responsible for this difference. However, the fraction of expired isoflurane was similar between the three groups, meaning that this effect uniformly applied to all groups of rats. Thirdly, mitochondrial respiratory function was not explored although some mitochondria alterations were suggested after TBI (46). However, the parallel changes in brain oxygenation and edema according to whether injured animals were given rhEPO suggest that the utilization rate of oxygen by mitochondria was not a limiting factor. Fourthly, as mentioned above, we lack insights about the potential mechanisms by which rhEPO improves brain oxygenation. We are currently investigating whether this could depend upon aquaporin-4 water transport since rhEPO was shown to reduce the permeability of astrocyte aquaporin-4 (47).

In conclusion, our findings add to the accumulating evidence of brain tissue hypoxia following diffuse TBI despite no evidence of macrovascular ischemia. The development of post-traumatic brain edema can reduce cell oxygen delivery by compressing underlying capillaries. These alterations between injured tissue and its microcirculatory environment were corrected with rhEPO treatment. These findings may reinforce the rationale for targeting interventions that improve and maintain brain oxygenation in TBI studies.

References

1. Bratton SL, Chestnut RM, Ghajar J, et al: Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. IX. Cerebral perfusion thresholds. *J Neurotrauma* 2007; 24 Suppl 1:S59-64

2. Chang JJ, Youn TS, Benson D, et al: Physiologic and functional outcome correlates of brain tissue hypoxia in traumatic brain injury. *Crit Care Med* 2009; 37:283-290

3. Oddo M, Levine JM, Mackenzie L, et al: Brain Hypoxia Is Associated With Shortterm Outcome After Severe Traumatic Brain Injury Independently of Intracranial
Hypertension and Low Cerebral Perfusion Pressure. *Neurosurgery* 2011; 69:1037-1045

4. Stiefel MF, Spiotta A, Gracias VH, et al: Reduced mortality rate in patients with severe traumatic brain injury treated with brain tissue oxygen monitoring. *J Neurosurg* 2005; 103:805-811

5. Narotam PK, Morrison JF, Nathoo N: Brain tissue oxygen monitoring in traumatic brain injury and major trauma: outcome analysis of a brain tissue oxygen-directed therapy. *J Neurosurg* 2009; 111:672-682

6. Rosenthal G, Hemphill JC, 3rd, Sorani M, et al: Brain tissue oxygen tension is more indicative of oxygen diffusion than oxygen delivery and metabolism in patients with 7. Masamoto K, Tanishita K: Oxygen transport in brain tissue. *J Biomech Eng* 2009; 131:074002

8. Jespersen SN, Ostergaard L: The roles of cerebral blood flow, capillary transit time heterogeneity, and oxygen tension in brain oxygenation and metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; 32:264-277

9. Vaz R, Sarmento A, Borges N, et al: Ultrastructural study of brain microvessels in patients with traumatic cerebral contusions. *Acta Neurochir (Wien)* 1997; 139:215-220

10. Rodriguez-Baeza A, Reina-de la Torre F, Poca A, et al: Morphological features in human cortical brain microvessels after head injury: a three-dimensional and immunocytochemical study. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003; 273:583-593

11. Bullock R, Maxwell WL, Graham DI, et al: Glial swelling following human cerebral contusion: an ultrastructural study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991; 54:427-434

12. Dietrich WD, Alonso O, Halley M: Early microvascular and neuronal consequences of traumatic brain injury: a light and electron microscopic study in rats. *J Neurotrauma* 1994; 11:289-301

13. Schwarzmaier SM, Kim SW, Trabold R, et al: Temporal profile of thrombogenesis in the cerebral microcirculation after traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* 2010; 27:121-130

14. Menon DK, Coles JP, Gupta AK, et al: Diffusion limited oxygen delivery following head injury. *Crit Care Med* 2004; 32:1384-1390

15. Velly L, Pellegrini L, Guillet B, et al: Erythropoietin 2nd cerebral protection after acute injuries: A double-edged sword? *Pharmacol Ther* 2010; 128:445-459

16. Ponce LL, Navarro JC, Ahmed O, et al: Erythropoietin neuroprotection with traumatic brain injury. *Pathophysiology* 2012; doi.org/10.1016/j. pathophys.2012.02.005

17. Yatsiv I, Grigoriadis N, Simeonidou C, et al: Erythropoietin is neuroprotective, improves functional recovery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury. *Faseb J* 2005; 19:1701-1703.

18. Robertson CS, Garcia R, Gaddam SS, et al: Treatment of Mild Traumatic Brain Injury with an Erythropoietin - Mimetic Peptide. *J Neurotrauma* 2012; doi:10.1089/neu.2012.2431

19. Verdonck O, Lahrech H, Francony G, et al: Erythropoietin protects from posttraumatic edema in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27:1369-1376

20. Bouzat P, Francony G, Thomas S, et al: Reduced brain edema and functional deficits after treatment of diffuse traumatic brain injury by carbamylated erythropoietin derivative. *Crit Care Med* 2011; 39:2099-2105

21. Xiong Y, Mahmood A, Qu C, et al: Erythropoietin improves histological and functional outcomes after traumatic brain injury in mice in the absence of the neural erythropoietin receptor. *J Neurotrauma* 2010; 27:205-215

22. Cherian L, Goodman JC, Robertson C: Neuroprotection with erythropoietin administration following controlled cortical impact injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther*
2007; 322:789-794
23. Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, et al: A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg* 1994; 80:291 300.
24. Christen T, Lemasson B, Pannetier N, et al: Evaluation of a quantitative blood oxygenation level-dependent (qBOLD) approach to map local blood oxygen saturation. *NMR Biomed* 2011; 24:393-403
25. Barbier EL, Lamalle L, Decorps M: Methodology of brain perfusion imaging. *J Magn Reson Imaging* 2001; 13:496-520.
26. Tropres I, Grimault S, Vaeth A, et al: Vessel size imaging. *Magn Reson Med* 2001; 45:397-408.
27. Lemasson B, Christen T, Tizon X, et al: Assessment of multiparametric MRI in a human glioma model to monitor cytotoxic and anti-angiogenic drug effects. *NMR Biomed* 2011; 24:473-482
28. Christen T, Zaharchuk G, Pannetier N, et al: Quantitative MR estimates of blood oxygenation based on T2*: a numerical study of the impact of model assumptions. *Magn Reson Med* 2012; 67:1458-1468
29. Spees WM, Yablonskiy DA, Oswood MC, et al: Water proton MR properties of
human blood at 1.5 Tesla: magnetic susceptibility, T(1), T(2), T*(2), and non-Lorentzian signal behavior. *Magn Reson Med* 2001; 45:533-542
30. He X, Yablonskiy DA: Quantitative BOLD: mapping of human cerebral deoxygenated blood volume and oxygen extraction fraction: default state. *Magn Reson Med* 2007; 57:115- 126
31. An H, Liu Q, Chen Y, et al: Evaluation of MR-derived cerebral oxygen metabolic index in experimental hyperoxic hypercapnia, hypoxia, and ischemia. *Stroke* 2009; 40:2165-2172
32. Christen T, Lemasson B, Pannetier N, et al: Is T2* enough to assess oxygenation? Quantitative blood oxygen level-dependent analysis in brain tumor. *Radiology* 2012; 262:495-502

33. Valable S, Lemasson B, Farion R, et al: Assessment of blood volume, vessel size, and the expression of angiogenic factors in two rat glioma models: a longitudinal in vivo and ex vivo study. *NMR Biomed* 2008; 21:1043-1056

34. Johnston AJ, Steiner LA, Coles JP, et al: Effect of cerebral perfusion pressure augmentation on regional oxygenation and metabolism after head injury. *Crit Care Med* 2005; 33:189-195

35. Shimosegawa E, Hatazawa J, Ibaraki M, et al: Metabolic penumbra of acute brain infarction: a correlation with infarct growth. *Ann Neurol* 2005; 57:495-504

36. Menon DK: Procrustes, the traumatic penumbra, and perfusion pressure targets in closed head injury. *Anesthesiology* 2003; 98:805-807

37. Abate MG, Trivedi M, Fryer TD, et al: Early derangements in oxygen and glucose metabolism following head injury: the ischemic penumbra and pathophysiological heterogeneity. *Neurocrit Care* 2008; 9:319-325

38. Valable S, Francony G, Bouzat P, et al: 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; 30:361-369

39. Sakowitz OW, Stover JF, Sarrafzadeh AS, et al: Effects of Mannitol Bolus Administration on Intracranial Pressure, Cerebral Extracellular Metabolites, and Tissue Oxygenation in Severely Head-Injured Patients. *J Trauma* 2007; 62:292-298

40. Francony G, Fauvage B, Falcon D, et al: Equimolar doses of mannitol and hypertonic saline in the treatment of increased intracranial pressure. *Crit Care Med* 2008; 36:795-800

41. Diringer MN, Scalfani MT, Zazulia AR, et al: Cerebral hemodynamic and metabolic effects of equi-osmolar doses mannitol and 23.4% saline in patients with edema following large ischemic stroke. *Neurocrit Care* 2011; 14:11-17

42. Moriyama M, Jayakumar AR, Tong XY, et al: Role of mitogen-activated protein kinases in the mechanism of oxidant-induced cell swelling in cultured astrocytes. *J Neurosci Res* 2010; 88:2450-2458

43. Rao KV, Jayakumar AR, Reddy PV, et al: Aquaporin-4 in manganese-treated cultured astrocytes. *Glia* 2010; 58:1490-1499

44. Kilic E, Kilic U, Soliz J, et al: Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK-1/-2 and Akt pathways. *Faseb J* 2005; 19:2026-2028

45. Kroppenstedt SN, Thomale UW, Griebenow M, et al: Effects of early and late intravenous norepinephrine infusion on cerebral perfusion, microcirculation, brain-tissue oxygenation, and edema formation in brain-injured rats. *Crit Care Med* 2003; 31:2211-2221

46. Lifshitz J, Sullivan PG, Hovda DA, et al: Mitochondrial damage and dysfunction in traumatic brain injury. *Mitochondrion* 2004; 4:705-713

47. Gunnarson E, Song Y, Kowalewski JM, et al: Erythropoietin modulation of astrocytewater permeability as a component of neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:1602-1607

Tables

Table 1: Physiological data from the three groups of rats undergoing MRI: sham-operated (n = 11), TBI with saline (n = 11), TBI with rhEPO (n = 11). Data were collected one hour after the TBI impact (or equivalent time in sham-operated rats).

Variables	Sham operated	TBI-saline	TBI-rhEPO
MABP (mm Hg)	117 ± 20	108 ± 15	110 ± 13
PaO_2 (mm Hg)	119.0 ± 11.8	108.4 ± 6.4	110.0 ± 7.2
$PaCO_2$ (mm Hg)	36.6 ± 3.3	35.2 ± 2.7	35.0 ± 0.8
arterial pH	7.41 ± 0.02	7.39 ± 0.01	7.40 ± 0.05
Temperature (℃)	36.6 ± 0.5	36.3 ± 0.4	36.4 ± 0.8
Hemoglobin (g/L)	120 ± 18	117 ± 17	118 ± 13

Data are expressed as mean ± SD. MABP, mean arterial blood pressure.

Figures and legends:

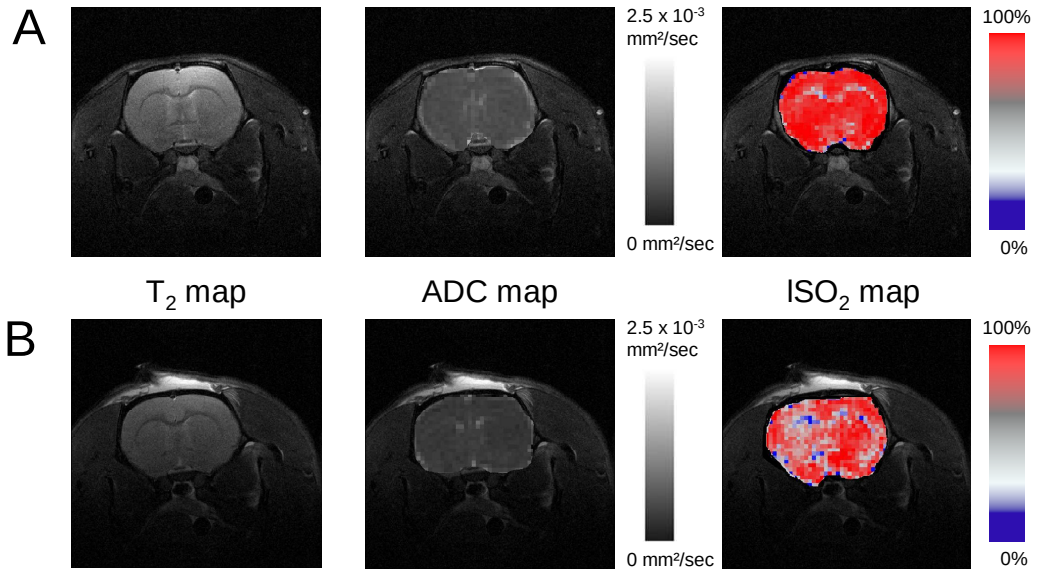


Figure 1. Representative T_2-weighted (left) image, apparent diffusion coefficient map (center) and ISO2 map (right) at H2 in a rat from the sham-operated group (panel A) and another following diffuse TBI (panel B). The two regions of interest, neocortex and caudoputamen, are delineated in each hemisphere from the T_2-weighted image.

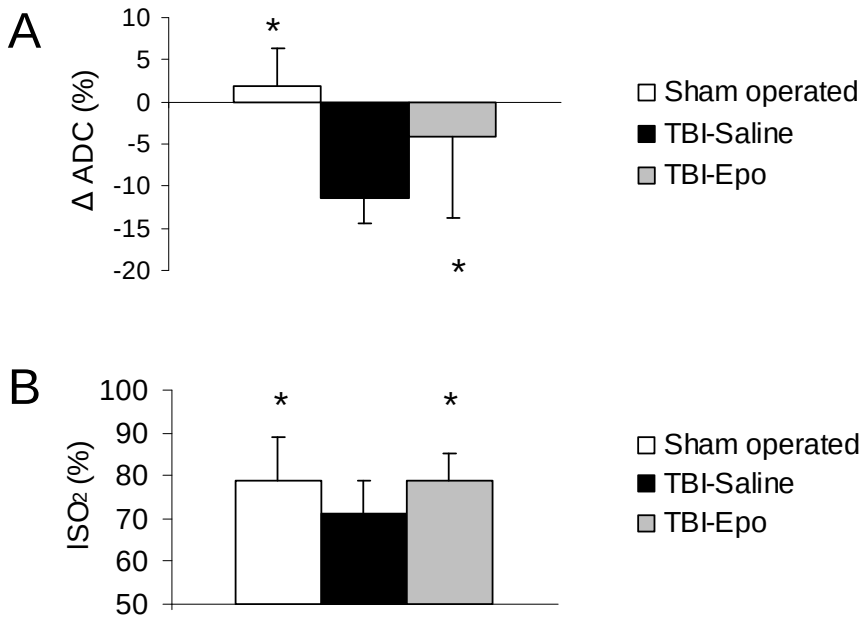


Figure 2: A. Changes (in percent) in averaged apparent diffusion coefficient (ΔADC) values of water in the neocortex and caudoputamen (four regions of interest) between baseline and 2 hrs (H2) after traumatic brain injury (TBI) in three groups of rats (n = 11 rats per group): sham-operated, TBI-saline and TBI-EPO. B. Average local tissue oxygen saturation (ISO_2) of the 4 brain regions of interest in the three groups of animals at H2. * $P<0.05$ vs. TBI-saline

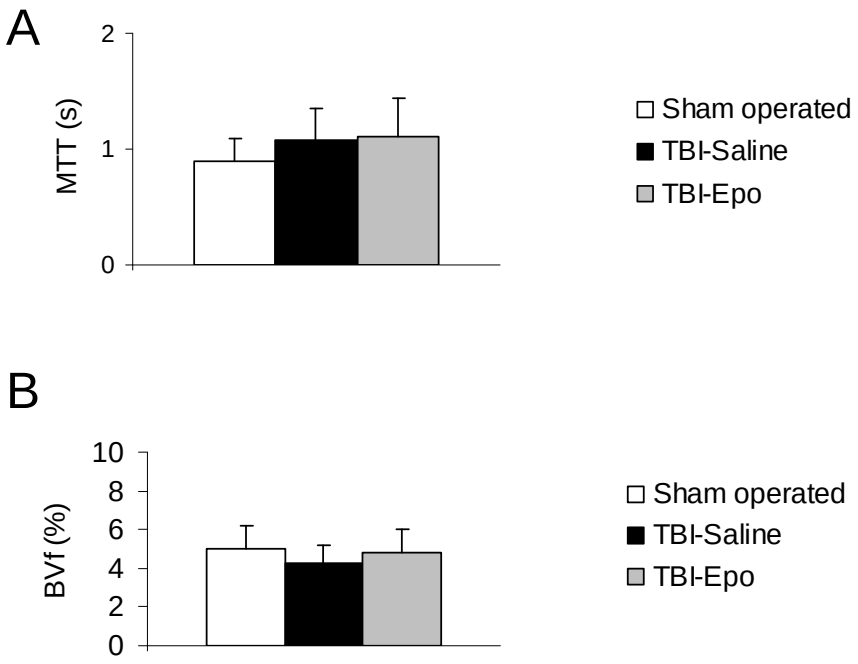


Figure 3: Average mean transit time (MTT, panel A) and average cerebral blood volume (BVf, panel B) of the four regions of interest obtained 2 hours after trauma (or equivalent time) in the three groups of rats (n = 11 per group): sham-operated, TBI-saline and TBI-EPO.

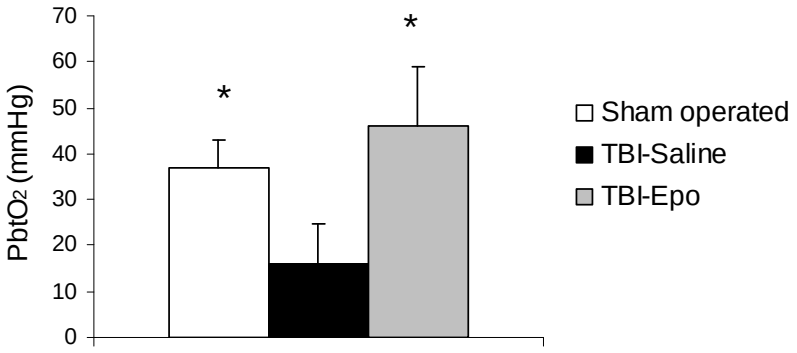


Figure 4: Brain tissue oxygenation (PbtO2) values obtained 2 hours after trauma (or equivalent time) in the three groups of rats (n = 5 per group): sham-operated, TBI-saline and TBI-EPO. * *P*<0.05 vs. TBI-Saline

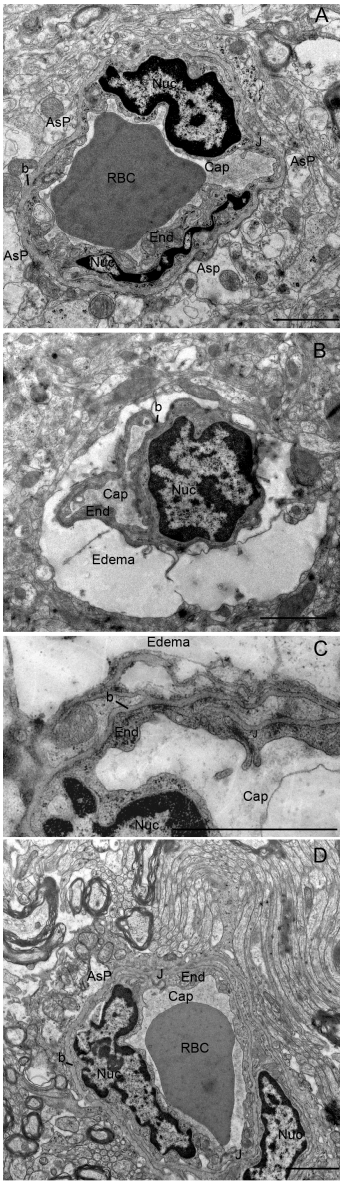


Figure 5: Ultrastructural appearance of the cortical tissue in sham-operated (A), TBI-saline (B and C) and TBI-EPO rats (D). *Panel A*, Electron micrograph of normal tissue (sham-operated). A capillary (cap) is formed by thin endothelial cells (End) with a nucleus (Nuc), and contains a red blood cell (RBC). Basal lamina (b) and astrocytic processes (AsP) surround the capillary. *Panels B and C,* Electron micrograph of injured tissue (TBI-saline). A capillary has a collapsed lumen due to astrocytic edema. Basal lamina and tight junctions (J) are intact, and the endothelium is not swollen. *Panel D,* Electron micrograph of injured tissue after treatment by rhEPO (TBI-EPO). Basal lamina and tight junctions (J) are intact, and the capillary lumen resembles that of control. Scale bar is 2 nm.

Conclusion et perspectives

L'objectif principal de ce travail a été d'évaluer l'érythropoïétine et son dérivé carbamylé sur l'œdème cérébral et l'hypoxie cérébrale post-traumatiques dans le modèle de TC par impact-accélération chez le rat.

Dans un premier temps, nous avons montré que l'érythropoïetine carbamylée (CEpo) possédait une action anti-oedémateuse précoce, jusqu'à 6 heures après le TC, médiée par l'inhibition de la voie Erk. Cette action anti-oedémateuse précoce s'est accompagnée d'une amélioration des scores neurocomportementaux des rats traités jusqu'à 10 jours après le TC. La CEpo possède également des propriétés anti-apoptotiques dont l'origine pourraît se trouver dans l'inhibition de l'ouverture du mPTP. L'effet anti-oedémateux est conservé lors d'une administration retardée, deux heures après le TC. L'originalité de ce travail repose sur la mise en évidence d'une action anti-oedémateuse précoce de la CEpo. En effet, les précédents travaux expérimentaux *in vivo* réalisés avec la CEpo dans le traumatisme crânien ont révélé une une diminution des lésions tissulaires cérébrales avec une amélioration des scores neurocomportementaux (Mahmood, Lu et al. 2007; Xiong, Mahmood et al. 2011). Le modèle utilisé alors était un modèle d'impact cortical contrôlé avec ouverture de la dure mère, très éloigné de la clinique. Outre l'avantage d'être plus proche de la réalité clinique, le modèle de TC par impact-accélération est un modèle d'œdème cérébral diffus d'origine cellulaire sans ouverture de la BHE (Valable, Francony et al. 2010). La CEpo, comme l'Epo (Verdonck, Lahrech et al. 2007), s'avère donc être un traitement étiologique de l'œdème cérébral post-traumatique. Même si cette propriété semble mettre en jeu la voie Erk, les mécanismes cellulaires directement impliqués restent indéterminés. La modification rapide du contenu en eau intra-cérébral dès 30 minutes après l'injection intra-veineuse de CEpo suppose la participation de transporteurs d'eau ; les aquaporines (AQP) de type 4 pourraient être ainsi les canaux impliqués dans cet effet anti-oedémateux. La quantité exprimée d'AQP par le cerveau deviendrait ainsi une donnée intéressante à recueillir en Western Blot dans notre modèle de TC. Puisque cet

effet semble très rapide, celui-ci suppose une mobilisation de ces canaux membranaires également, au-delà d'une simple néo-synthèse. L'étude de la localisation de ces protéines par immunohistochimie deviendrait ainsi cruciale pour comprendre le lien potentiel entre AQP, CEpo et œdème cérébral. De même, l'utilisation d'un inhibiteur des AQP pourraît être utile, le PMA semblant l'inhibiteur des AQP le plus facile à maitriser (Fazzina, Amorini et al. 2010). L'ensemble de ces manipulations est un projet actuellement réalisé par notre équipe et devrait permettre de mieux préciser les mécanismes cellulaires de l'effet anti-oedémateux commun à l'Epo et à la CEpo.

Nous avons observé une diminution de 1% du contenu en eau intracérébral. Cette faible diminution peut néanmoins avoir de fortes répercussions sur l'hypertension intracrânienne dans un cerveau à la compliance réduite. Ainsi, des mesures de PIC s'avéreraient également intéressantes dans notre modèle afin d'observer l'effet de la CEpo ou de l'Epo sur ce paramètre. La fréquence d'administration du traitement par CEpo reste également à explorer. Alors qu'un traitement retardé semble toujours efficace à la fois sur la clairance de l'œdème cérébral (Etude 1, résultats complémentaires) et sur la neurogénèse (Mahmood, Lu et al. 2007), la nécessité d'administrations itératives reste peu explorée. Dans le modèle d'impact cortical contrôlé, 3 injections à 6H, 24H et 48H après le TC ont montré un bénéfice supérieur à une seule injection, 6 heures après le TC, pour la réduction des lésions tisssulaires cérébrales (Xiong, Mahmood et al. 2011). Des injections itératives seraient ainsi également intéressantes à évaluer dans notre modèle, notamment sur l'activité anti-apoptotique de la CEpo.

Dans un deuxième temps, nous avons montré qu'une méthode IRM de mesure de la saturation locale en oxygène (ISO_2) basée sur la combinaison de l'effet BOLD avec une mesure du volume sanguin cérébral (VSC) à l'équilibre permettait d'étudier l'oxygénation cérébrale post-traumatique. Après une phase de validation de la technique sur rats sains soumis à différentes conditions d'oxygénation, nous avons ainsi montré que la ISO_2 post-traumatique chez le rat était abaissée par rapport à des rats sains en normoxie (63% ± 5% *vs* 76% ± 6%). Cette méthode de mesure est à la fois locale puisque la saturation est obtenue voxel par voxel mais aussi régionale puique plusieurs coupes de

cerveau peuvent être explorées. La transposition de cette technique à l'homme devient ainsi très intéressante pour sa résolution spatiale, contrairement à la mesure de la $PtiO_2$; un suivi de l'oxygénation au lit du patient n'est par contre pas envisageable en IRM. Les limites de cette technique pour une utilisation clinique demeurent identiques à celles de l'IRM chez les patients à la phase aigüe d'un TC : disponibilité de l'aimant, surveillance du patient souvent difficile en IRM et incompatibilité avec le matériel de type $PtiO_2$. Cependant, son accessibilité reste supérieure au TEP qui a recours à des isotopes de l'oxygène à demi-vie très courte. Cette technique est également disponible *in vivo* contrairement aux marqueurs histologiques de l'hypoxie tissulaire. Pour toutes ces raisons, l'application de cette technique à l'homme est en cours de développement au sein de l'équipe 5 (travail de thèse de Julien Bouvier).

Dans un troisième temps, nous avons montré que l'oxygénation cérébrale était altérée dans un modèle expérimental de TC diffus sans altérations du débit sanguin cérébral (DSC). Un traitement par érythropoïétine à doses neuroprotectrices était capable par son action anti-oedémateuse de restaurer l'oxygénation cérébrale post-traumatique. Pour mesurer l'oxygénation cérébrale nous avons utilisé la mesure IRM de la lSO_2 ainsi que la mesure optique de la $PtiO_2$. Nous avons ainsi confirmé la diminution de l'oxygénation cérébrale post-traumatique visualisée en IRM par une méthode classique ($PtiO_2$). Cette étude a permis également de mettre en avant l'origine microcirculatoire du trouble de l'oxygénation cérébrale post-traumatique puisque la macrocirculation étudiée par l'analyse des temps de transit moyen et du VSC demeurait inchangée selon les groupes de rats étudiés. Cette défaillance microcirculatoire est caractérisable en microscopie électronique, montrant un collapsus des capillaires cérébraux par les pieds astrocytaires oedématiés deux heures après le TC. Cette constatation est en accord avec d'autres auteurs évoquant un trouble de la diffusion de l'oxygène post-traumatique responsable d'une inadaptation de l'OEF des zones contuses lors d'une épreuve d'hyperventilation chez des patients victimes d'un TC grave (Menon, Coles et al. 2004). Dans notre modèle également, une épreuve d'hyperventilation serait utile afin d'illustrer l'incapacité du cerveau lésé à extraire davantage d'oxygène malgré la baisse du DSC induite. L'étude

dynamique de la microcirculation serait également intéressante afin de mieux caractériser le temps de transit des globules rouges dans les capillaires, facteur semblant essentiel pour l'extraction de l'oxygène (Jespersen et Ostergaard 2012). Récemment, une technique de microscopie biphotonique a été capable de mesurer *in vivo* le débit sanguin capillaire ainsi que la PO_2 capillaire (Lecoq, Parpaleix et al. 2011) à une profondeur de 300 µm. L'utilisation de cette technique dans notre modèle pourrait ainsi évaluer la microcirculation corticale, à crâne ouvert, chez les rats traumatisés, afin de valider l'hypothèse selon laquelle le transit des globules rouges est ralenti par l'œdème astrocytaire péricapillaire. Enfin, reste à préciser l'intéraction exacte entre œdème cérébral et hypoxie cérébrale. La diminution de l'œdème cérébral semble interagir avec l'oxygénation cérébrale. Il serait également intéressant de préciser s'il est possible d'agir sur l'oxygénation cérébrale malgré l'apparition de l'œdème cérébral. Les moyens thérapeutiques ainsi évalués pourraît être l'hyperoxie cérébrale, améliorant la diffusibilité de l'oxygène ou l'hypothermie thérapeutique, diminuant la $CMRO_2$. Notre modèle de TC permettrait ainsi d'étudier ces differents moyens thérapeutiques en expérimental.

L'érythropoïétine, agent anti-oedémateux dans notre modèle (Verdonck, Lahrech et al. 2007; Valable, Francony et al. 2010), a restauré l'oxygénation cérébrale des rats traumatisés à un niveau comparable aux rats témoins. La microscopie électronique retrouvait alors une dimunition de l'œdème des pieds astrocytaires. L'utilisation de thérapeutique osmotique comme le mannitol serait également intéressante afin de comparer l'effet purement osmotique de cette molécule avec l'effet anti-oedémateux de l'érythropoïétine. Enfin, les aquaporines ayant une distribution préférentielle au niveau des pieds astrocytaires (Papadopoulos et Verkman 2007), la mise en évidence d'un œdème cellulaire précoce prédominant au niveau des pieds astrocytaires suggère également un rôle potentiel de ces canaux dans la constitution et la clairance de l'œdème cérébral post-traumatique.

En conclusion, l'érythropoïétine et son dérvivé carbamylé possèdent des propriétés anti-oedémateuses dans le modèle expérimental de traumatisme crânien diffus. L'action anti-oedémateuse de l'érythropoïétine s'accompagne d'une amélioration de l'oxygénation cérébrale mesurée par IRM et par méthode

optique. Cette action sur l'oxygénation cérébrale s'explique par une diminution de la contrainte microcirculatoire exercée par les pieds astrocytaires oedématiés. L'ensemble de ces résultats conforte la place de l'érythropoïétine et de ses dérivés en tant qu'agent neuroprotecteur dans le traumatisme crânien. Ainsi, l'érythropoïétine fait actuellement l'objet d'un essai clinique de phase III (ClinialTrials.gov : NCT00987454). Ces résultats soulignent également le rôle des troubles microcirculatoires secondaires au traumatisme crânien dans l'hypoxie cérébrale post-traumatique. L'étude de l'oxygénation cérébrale et de ses différents déterminants chez les patients traumatisés crâniens s'avèrent ainsi un point fondamental de la neuroréanimation afin de mettre en place des thérapeutiques visant à restaurer la balance entre les apports et les besoins en oxygène du cerveau agressé.

Références bibliographiques

Abelson-Mitchell, N. (2008). Epidemiology and prevention of head injuries: literature review. J Clin Nurs 17, 46-57.

Adamides, A. A., D. J. Cooper, et al. (2009). Focal cerebral oxygenation and neurological outcome with or without brain tissue oxygen-guided therapy in patients with traumatic brain injury. Acta Neurochir (Wien) 151(11): 1399-409.

Adembri, C., A. Massagrande, et al. (2008). Carbamylated erythropoietin is neuroprotective in an experimental model of traumatic brain injury. Crit Care Med 36, 975-8.

Albensi, B. C., S. M. Knoblach, et al. (2000). Diffusion and high resolution MRI of traumatic brain injury in rats: time course and correlation with histology. Exp Neurol 162, 61-72.

Aluclu, M. U., A. Acar, et al. (2007). Evaluation of erythropoietin effects on cerebral ischemia in rats. Neuro Endocrinol Lett 28, 170-4.

An, H., Q. Liu, et al. (2009). Evaluation of MR-derived cerebral oxygen metabolic index in experimental hyperoxic hypercapnia, hypoxia, and ischemia. Stroke 40, 2165-72.

Assandri, R., M. Egger, et al. (1999). Erythropoietin modulates intracellular calcium in a human neuroblastoma cell line. J Physiol 516, 343-52.

Banks, W. A., N. L. Jumbe, et al. (2004). Passage of erythropoietic agents across the blood-brain barrier: a comparison of human and murine erythropoietin and the analog darbepoetin alfa. Eur J Pharmacol 505, 93-101.

Barbier, E. L., L. Liu, et al. (2005). Focal brain ischemia in rat: acute changes in brain tissue T1 reflect acute increase in brain tissue water content. NMR Biomed 18, 499-506.

Barker, B. R., R. P. Mason, et al. (1994). Oxygen tension mapping with F-19 echo-planar MR imaging of sequestered perfluorocarbon. J Magn Reson Imaging 4, 595-602.

Barzo, P., A. Marmarou, et al. (1996). Magnetic resonance imaging-monitored acute blood-brain barrier changes in experimental traumatic brain injury. J Neurosurg 85, 1113-21.

Barzo, P., A. Marmarou, et al. (1997). Biphasic pathophysiological response of vasogenic and cellular edema in traumatic brain swelling. Acta Neurochir Suppl 70, 119-22.

Beaumont, A., P. Fatouros, et al. (2006). Bolus tracer delivery measured by MRI confirms edema without blood-brain barrier permeability in diffuse traumatic brain injury. Acta Neurochir Suppl 96, 171-4.

Belanger, M., I. Allaman, et al. (2011). Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. Cell Metab 14, 724-38.

Beleslin-Cokic, B. B., V. P. Cokic, et al. (2004). Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. Blood 104, 2073-80.

Bennett, C. L., S. M. Silver, et al. (2008). Venous thromboembolism and mortality associated with recombinant erythropoietin and darbepoetin administration for the treatment of cancer-associated anemia. JAMA 299, 914-24.

Bergsneider, M., D. A. Hovda, et al. (1997). Cerebral hyperglycolysis following severe traumatic brain injury in humans: a positron emission tomography study. J Neurosurg 86, 241-51.

Bernaudin, M., A. Bellail, et al. (2000). Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. Glia 30, 271-8.

Bernaudin, M., H. H. Marti, et al. (1999). A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. J Cereb Blood Flow Metab 19, 643-51.

Besson, V. C. (2009). Drug targets for traumatic brain injury from poly(ADP-ribose) polymerase pathway modulation. Br J Pharmacol 157, 695-704.

Beynon, C., K. L. Kiening, et al. (2012). Brain tissue oxygen monitoring and hyperoxic treatment in patients with traumatic brain injury. J Neurotrauma 29, 2109-23.

Bianchi, R., M. Brines, et al. (2006). Protective effect of erythropoietin and its carbamylated derivative in experimental Cisplatin peripheral neurotoxicity. Clin Cancer Res 12, 2607-12.

Bohlius, J., K. Schmidlin, et al. (2009). Erythropoietin or Darbepoetin for patients with cancer--meta-analysis based on individual patient data. Cochrane Database Syst Rev(3): CD007303.

Boto, G. R., P. A. Gomez, et al. (2009). A historical analysis of severe head injury. Neurosurg Rev 32, 343-53; discussion 353-4.

Bouma, G. J., J. P. Muizelaar, et al. (1991). Cerebral circulation and metabolism after severe traumatic brain injury: the elusive role of ischemia. J Neurosurg 75, 685-93.

Bouma, G. J., J. P. Muizelaar, et al. (1992). Ultra-early evaluation of regional cerebral blood flow in severely head-injured patients using xenon-enhanced computerized tomography. J Neurosurg 77, 360-8.

Bratton, S. L., R. M. Chestnut, et al. (2007). Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. IX. Cerebral perfusion thresholds. J Neurotrauma 24 Suppl 1, S59-64.

Bratton, S. L., R. M. Chestnut, et al. (2007). Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. VIII. Intracranial pressure thresholds. J Neurotrauma 24 Suppl 1, S55-8.

Bredesen, D. E., R. V. Rao, et al. (2006). Cell death in the nervous system. Nature 443, 796-802.

Brines, M. and A. Cerami (2005). Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. Nat Rev Neurosci 6, 484-94.

Brines, M., G. Grasso, et al. (2004). Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 14907-12.

Brines, M., N. S. Patel, et al. (2008). Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin. Proc Natl Acad Sci U S A 105,10925-30.

Brines, M. L., P. Ghezzi, et al. (2000). Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 10526-31.

Buemi, M., E. Cavallaro, et al. (2003). The pleiotropic effects of erythropoietin in the central nervous system. J Neuropathol Exp Neurol 62, 228-36.

Bullock, R., W. L. Maxwell, et al. (1991). Glial swelling following human cerebral contusion: an ultrastructural study. J Neurol Neurosurg Psychiatry 54, 427-34.

Carson, K. R., A. M. Evens, et al. (2005). Clinical characteristics of erythropoietin-associated pure red cell aplasia. Best Pract Res Clin Haematol 18, 467-72.

Castejon, O. J. and H. V. de Castejon (2004). Structural patterns of injured mitochondria in human oedematous cerebral cortex. Brain Inj 18, 1107-26.

Chen, Y. and R. A. Swanson (2003). Astrocytes and brain injury. J Cereb Blood Flow Metab 23,137-49.

Cherian, L., J. C. Goodman, et al. (2007). Neuroprotection with erythropoietin administration following controlled cortical impact injury in rats. J Pharmacol Exp Ther 322, 789-94.

Christen, T., B. Lemasson, et al. (2011). Evaluation of a quantitative blood oxygenation level-dependent (qBOLD) approach to map local blood oxygen saturation. NMR Biomed 24, 393-403.

Chu, K., K. H. Jung, et al. (2008). Erythropoietin reduces epileptogenic processes following status epilepticus. Epilepsia 49,1723-32.

Coles, J. P., T. D. Fryer, et al. (2004). Defining ischemic burden after traumatic brain injury using 15O PET imaging of cerebral physiology. J Cereb Blood Flow Metab 24, 191-201.

Coles, J. P., P. S. Minhas, et al. (2002). Effect of hyperventilation on cerebral blood flow in traumatic head injury: clinical relevance and monitoring correlates. Crit Care Med 30,1950-9.

Corwin, H. L., A. Gettinger, et al. (2007). Efficacy and safety of epoetin alfa in critically ill patients. N Engl J Med 357, 965-76.

Corwin, H. L., A. Gettinger, et al. (2002). Efficacy of recombinant human erythropoietin in critically ill patients: a randomized controlled trial. JAMA 288, 2827-35.

Critchley, G. R. and B. A. Bell (2003). Acute cerebral tissue oxygenation changes following experimental subarachnoid hemorrhage. Neurol Res 25(5): 451-6.

Cunningham, A. S., R. Salvador, et al. (2005). Physiological thresholds for irreversible tissue damage in contusional regions following traumatic brain injury. Brain 128, 1931-42.

Davis, D. P., M. Kene, et al. (2007). Head-injured patients who talk and die : the San Diego perspective. J Trauma 62, 277-81.

Davis, T. L., K. K. Kwong, et al. (1998). Calibrated functional MRI: mapping the dynamics of oxidative metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 1834-9.

Denker, B. M., B. L. Smith, et al. (1988). Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. J Biol Chem 263, 15634-42.

Ding, J. Y., C. W. Kreipke, et al. (2009). Hypoxia-inducible factor-1alpha signaling in aquaporin upregulation after traumatic brain injury. Neurosci Lett 453, 68-72.

Doll, H., N. Davies, et al. (2009). One sensor fits all--a new approach in monitoring brain physiology. Adv Exp Med Biol 645, 175-80.

Duyn, J. H., P. van Gelderen, et al. (2007). High-field MRI of brain cortical substructure based on signal phase. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 11796-801.

Ehrenreich, H., C. Aust, et al. (2004). Erythropoietin: novel approaches to neuroprotection in human brain disease. Metab Brain Dis 19, 195-206.

Ehrenreich, H., M. Hasselblatt, et al. (2002). Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. Mol Med 8, 495-505.

Ehrenreich, H., K. Weissenborn, et al. (2009). Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. Stroke 40, 647-56.

Enriquez, P. and R. Bullock (2004). Molecular and cellular mechanisms in the pathophysiology of severe head injury. Curr Pharm Des 10, 2131-43.

Erbayraktar, S., N. de Lanerolle, et al. (2006). Carbamylated erythropoietin reduces radiosurgically-induced brain injury. Mol Med 12, 74-80.

Erbayraktar, S., G. Grasso, et al. (2003). Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 6741-6.

Esneault, E., E. Pacary, et al. (2008). Combined therapeutic strategy using erythropoietin and mesenchymal stem cells potentiates neurogenesis after transient focal cerebral ischemia in rats. J Cereb Blood Flow Metab 28, 1552-63.

Farkas, O. and J. T. Povlishock (2007). Cellular and subcellular change evoked by diffuse traumatic brain injury: a complex web of change extending far beyond focal damage. Prog Brain Res 161, 43-59.

Fatouros, P. P. and A. Marmarou (1999). Use of magnetic resonance imaging for in vivo measurements of water content in human brain: method and normal values. J Neurosurg 90, 109-15.

Fatouros, P. P., A. Marmarou, et al. (1991). In vivo brain water determination by T1 measurements: effect of total water content, hydration fraction, and field strength. Magn Reson Med 17, 402-13.

Fazzina, G., A. M. Amorini, et al. (2010). The protein kinase C activator phorbol myristate acetate decreases brain edema by aquaporin 4 downregulation after middle cerebral artery occlusion in the rat. J Neurotrauma 27, 453-61.

Fiordaliso, F., S. Chimenti, et al. (2005). A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 2046-51.

Fisher, J. W. (2003). Erythropoietin: physiology and pharmacology update. Exp Biol Med (Maywood) 228, 1-14.

Fletcher, L., S. Kohli, et al. (2009). Intranasal delivery of erythropoietin plus insulin-like growth factor-I for acute neuroprotection in stroke. Laboratory investigation. J Neurosurg 111, 164-70.

Foda, M. A. and A. Marmarou (1994). A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. J Neurosurg 80, 301-13.

Francony, G., P. Bouzat, et al. (2012). Le monitorage par septroscopie de proche infrarouge en neuroréanimation". Ann Fr Anesth Reanim 31, 133-6.

Fuste, B., M. Serradell, et al. (2002). Erythropoietin triggers a signaling pathway in endothelial cells and increases the thrombogenicity of their extracellular matrices in vitro. Thromb Haemost 88, 678-85.

Galluzzi, L., K. Blomgren, et al. (2009). Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. Nat Rev Neurosci 10, 481-94.

Genc, S., T. F. Koroglu, et al. (2004). Erythropoietin and the nervous system. Brain Res 1000, 19-31.

Ghezzi, P. and M. Brines (2004). Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. Cell Death Differ 11, S37-44.

Glenn, T. C., D. F. Kelly, et al. (2003). Energy dysfunction as a predictor of outcome after moderate or severe head injury: indices of oxygen, glucose, and lactate metabolism. J Cereb Blood Flow Metab 23,1239-50.

Goetz, P., A. Blamire, et al. (2004). Increase in apparent diffusion coefficient in normal appearing white matter following human traumatic brain injury correlates with injury severity. J Neurotrauma 21, 645-54.

Gopinath, S. P., C. S. Robertson, et al. (1994). Jugular venous desaturation and outcome after head injury. J Neurol Neurosurg Psychiatry 57, 717-23.

Gordon, G. R., H. B. Choi, et al. (2008). Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. Nature 456, 745-9.

Graham, D. I. and J. H. Adams (1971). Ischaemic brain damage in fatal head injuries. Lancet 1, 265-6.

Graham, D. I., J. H. Adams, et al. (1978). Ischaemic brain damage in fatal non-missile head injuries. J Neurol Sci 39, 213-34.

Grasso, G., A. Sfacteria, et al. (2007). Neuroprotection by erythropoietin administration after experimental traumatic brain injury. Brain Res 1182, 99-105.

Grubb, R. L., Jr., M. E. Raichle, et al. (1974). The effects of changes in PaCO2 on cerebral blood volume, blood flow, and vascular mean transit time. Stroke 5, 630-9.

Guha, M. and N. Mackman (2002). The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. J Biol Chem 277, 32124-32.

Haacke, E. M., N. Y. Cheng, et al. (2005). Imaging iron stores in the brain using magnetic resonance imaging. Magn Reson Imaging 23, 1-25.

Haitsma, I. K. and A. I. Maas (2002). Advanced monitoring in the intensive care unit: brain tissue oxygen tension. Curr Opin Crit Care 8, 115-20.

Haorah, J., S. H. Ramirez, et al. (2007). Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. J Neurochem 101, 566-76.

Hardee, M. E., Y. Cao, et al. (2007). Erythropoietin blockade inhibits the induction of tumor angiogenesis and progression. PLoS One 2, 549.

Hartl, R., M. Medary, et al. (1997). Blood-brain barrier breakdown occurs early after traumatic brain injury and is not related to white blood cell adherence. Acta Neurochir Suppl 70, 240-2.

Hasselblatt, M., H. Ehrenreich, et al. (2006). The brain erythropoietin system and its potential for therapeutic exploitation in brain disease. J Neurosurg Anesthesiol 18, 132-8.

He, X. and D. A. Yablonskiy (2007). Quantitative BOLD: mapping of human cerebral deoxygenated blood volume and oxygen extraction fraction: default state. Magn Reson Med 57, 115-26.

Helbok, R., E. Shaker, et al. (2012). High dose Erythropoietin increases brain tissue oxygen tension in Severe Vasospasm after Subarachnoid Hemorrhage. BMC Neurol 12, 32.

Hellal, F., D. Bonnefont-Rousselot, et al. (2004). Pattern of cerebral edema and hemorrhage in a mice model of diffuse brain injury. Neurosci Lett 357, 21-4.

Hergan, K., P. W. Schaefer, et al. (2002). Diffusion-weighted MRI in diffuse axonal injury of the brain. Eur Radiol 12, 2536-41.

Hirt, L., B. Ternon, et al. (2009). Protective role of early aquaporin 4 induction against postischemic edema formation. J Cereb Blood Flow Metab 29, 423-33.

Hoskin, P. J., A. Sibtain, et al. (2003). GLUT1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in bladder cancer: relationship with vascularity and proliferation as predictors of outcome of ARCON. Br J Cancer 89(7): 1290-7.

Hu, H., H. T. Yao, et al. (2005). Increased expression of aquaporin-4 in human traumatic brain injury and brain tumors. J Zhejiang Univ Sci B 6, 33-7.

Huang, R. Q., H. L. Cheng, et al. (2010). Preliminary study on the effect of trauma-induced secondary cellular hypoxia in brain injury. Neurosci Lett 473, 22-7.

Huisman, T. A. (2003). Diffusion-weighted imaging: basic concepts and application in cerebral stroke and head trauma. Eur Radiol 13, 2283-97.

Imamura, R., Y. Isaka, et al. (2007). Carbamylated erythropoietin protects the kidneys from ischemia-reperfusion injury without stimulating erythropoiesis. Biochem Biophys Res Commun 353, 786-92.

Imamura, R., Y. Isaka, et al. (2012). A nonerythropoietic derivative of erythropoietin inhibits tubulointerstitial fibrosis in remnant kidney. Clin Exp Nephrol. Sous presse.

Ito, J., A. Marmarou, et al. (1996). Characterization of edema by diffusion-weighted imaging in experimental traumatic brain injury. J Neurosurg 84, 97-103.

Jaggi, J. L., W. D. Obrist, et al. (1990). Relationship of early cerebral blood flow and metabolism to outcome in acute head injury. J Neurosurg 72,176-82.

Jayakumar, A. R., K. V. Rao, et al. (2008). Trauma-induced cell swelling in cultured astrocytes. J Neuropathol Exp Neurol 67, 417-27.

Jespersen, S. N. and L. Ostergaard (2012). The roles of cerebral blood flow, capillary transit time heterogeneity, and oxygen tension in brain oxygenation and metabolism. J Cereb Blood Flow Metab 32, 264-77.

Kaiser, K., A. Texier, et al. (2006). Recombinant human erythropoietin prevents the death of mice during cerebral malaria. J Infect Dis 193, 987-95.

Kanagy, N. L., M. F. Perrine, et al. (2003). Erythropoietin administration in vivo increases vascular nitric oxide synthase expression. J Cardiovasc Pharmacol 42, 527-33.

Kawakami, M., M. Sekiguchi, et al. (2001). Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia. J Biol Chem 276, 39469-75.

Khuri, F. R. (2007). Weighing the hazards of erythropoiesis stimulation in patients with cancer. N Engl J Med 356, 2445-8.

Kiening, K. L., A. W. Unterberg, et al. (1996). Monitoring of cerebral oxygenation in patients with severe head injuries: brain tissue PO2 versus jugular vein oxygen saturation. J Neurosurg 85, 751-7.

Kilic, E., U. Kilic, et al. (2005). Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK-1/-2 and Akt pathways. FASEB J 19, 2026-8.

Kimelberg, H. K. (2004). Water homeostasis in the brain: basic concepts. Neuroscience 129, 851-60.

King, V. R., S. A. Averill, et al. (2007). Erythropoietin and carbamylated erythropoietin are neuroprotective following spinal cord hemisection in the rat. Eur J Neurosci 26, 90-100.

Kumral, A., S. Gonenc, et al. (2005). Erythropoietin increases glutathione peroxidase enzyme activity and decreases lipid peroxidation levels in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. Biol Neonate 87, 15-8.

Kurth, C. D., W. J. Levy, et al. (2002). Near-infrared spectroscopy cerebral oxygen saturation thresholds for hypoxia-ischemia in piglets. J Cereb Blood Flow Metab 22, 335-41.

Lapchak, P. A., A. Kirkeby, et al. (2008). Therapeutic window for nonerythropoietic carbamylated-erythropoietin to improve motor function following multiple infarct ischemic strokes in New Zealand white rabbits. Brain Res 1238, 208-14.

Le, D., R. P. Mason, et al. (1997). Regional tumor oxygen dynamics: 19F PBSR EPI of hexafluorobenzene. Magn Reson Imaging 15, 971-81.

Lecoq, J., A. Parpaleix, et al. (2011). Simultaneous two-photon imaging of oxygen and blood flow in deep cerebral vessels. Nat Med 17, 893-8.

Leist, M., P. Ghezzi, et al. (2004). Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. Science 305, 239-42.

Leyland-Jones, B. (2003). Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly. Lancet Oncol 4, 459-60.

Li, Y., Z. Y. Lu, et al. (2007). Erythropoietin prevents blood brain barrier damage induced by focal cerebral ischemia in mice. Neurochem Res 32, 2132-41.

Liao, Z. B., X. G. Zhi, et al. (2008). Recombinant human erythropoietin administration protects cortical neurons from traumatic brain injury in rats. Eur J Neurol 15,140-9.

Lifshitz, J., P. G. Sullivan, et al. (2004). Mitochondrial damage and dysfunction in traumatic brain injury. Mitochondrion 4, 705-13.

Liu, A. Y., J. A. Maldjian, et al. (1999). Traumatic brain injury: diffusion-weighted MR imaging findings. AJNR Am J Neuroradiol 20, 1636-41.

Lu, D., A. Mahmood, et al. (2005). Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain injury. J Neurotrauma 22, 1011-7.

Mahmood, A., D. Lu, et al. (2007). Treatment of traumatic brain injury with a combination therapy of marrow stromal cells and atorvastatin in rats. Neurosurgery 60, 546-53; discussion 553-4.

Mahmood, A., D. Lu, et al. (2007). Treatment of traumatic brain injury in rats with erythropoietin and carbamylated erythropoietin. J Neurosurg 107, 392-7.

Maloney-Wilensky, E., V. Gracias, et al. (2009). Brain tissue oxygen and outcome after severe traumatic brain injury: a systematic review. Crit Care Med 37, 2057-63.

Manley, G. T., M. Fujimura, et al. (2000). Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. Nat Med 6, 159-63.

Marmarou, A. (1992). Intracellular acidosis in human and experimental brain injury. J Neurotrauma 9 Suppl 2, S551-62.

Marmarou, A. (2003). Pathophysiology of traumatic brain edema: current concepts. Acta Neurochir Suppl 86, 7-10.

Marmarou, A., P. P. Fatouros, et al. (2000). Contribution of edema and cerebral blood volume to traumatic brain swelling in head-injured patients. J Neurosurg 93, 183-93.

Marmarou, A., M. A. Foda, et al. (1994). A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. J Neurosurg 80, 291-300.

Marmarou, A., G. Portella, et al. (2000). Distinguishing between cellular and vasogenic edema in head injured patients with focal lesions using magnetic resonance imaging. Acta Neurochir Suppl 76, 349-51.

Marmarou, A., S. Signoretti, et al. (2006). Predominance of cellular edema in traumatic brain swelling in patients with severe head injuries. J Neurosurg 104, 720-30.

Marti, H. H. (2004). Erythropoietin and the hypoxic brain. J Exp Biol 207, 3233-42.

Martinez-Estrada, O. M., E. Rodriguez-Millan, et al. (2003). Erythropoietin protects the in vitro blood-brain barrier against VEGF-induced permeability. Eur J Neurosci 18, 2538-44.

Martini, R. P., S. Deem, et al. (2009). Management guided by brain tissue oxygen monitoring and outcome following severe traumatic brain injury. J Neurosurg 111, 644-9.

Matéo, J., T. Lescot, et al. (2010). Neuromonitorage des traumatisma crâniens graves en réanimation à la phase aigue : Etat actuel des pratiques en Ile-de-France. Abstract SFAR.

Matsumoto, S., F. Hyodo, et al. (2008). Low-field paramagnetic resonance imaging of tumor oxygenation and glycolytic activity in mice. J Clin Invest 118, 1965-73.

Meixensberger, J., M. Jaeger, et al. (2003). Brain tissue oxygen guided treatment supplementing ICP/CPP therapy after traumatic brain injury. J Neurol Neurosurg Psychiatry 74, 760-4.

Mennini, T., M. De Paola, et al. (2006). Nonhematopoietic erythropoietin derivatives prevent motoneuron degeneration in vitro and in vivo. Mol Med 12, 153-60.

Menon, D. K., J. P. Coles, et al. (2004). Diffusion limited oxygen delivery following head injury. Crit Care Med 32, 1384-90.

Merritt, S., F. Bevilacqua, et al. (2003). Coregistration of diffuse optical spectroscopy and magnetic resonance imaging in a rat tumor model. Appl Opt 42, 2951-9.

Miyashita, K., A. Tojo, et al. (2004). Blood pressure response to erythropoietin injection in hemodialysis and predialysis patients. Hypertens Res 27, 79-84.

Moon, C., M. Krawczyk, et al. (2006). Erythropoietin, modified to not stimulate red blood cell production, retains its cardioprotective properties. J Pharmacol Exp Ther 316, 999-1005.

Morganti-Kossmann, M. C., L. Satgunaseelan, et al. (2007). Modulation of immune response by head injury. Injury 38, 1392-400.

Morishita, E., S. Masuda, et al. (1997). Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. Neuroscience 76, 105-16.

Moriyama, M., A. R. Jayakumar, et al. (2010). Role of mitogen-activated protein kinases in the mechanism of oxidant-induced cell swelling in cultured astrocytes. J Neurosci Res 88, 2450-8.

Nakazawa, J., K. Isshiki, et al. (2010). Renoprotective effects of asialoerythropoietin in diabetic mice against ischaemia-reperfusion-induced acute kidney injury. Nephrology (Carlton)15, 93-101.

Narayan, R. K., M. E. Michel, et al. (2002). Clinical trials in head injury. J Neurotrauma 19, 503-57.

Narotam, P. K., J. F. Morrison, et al. (2009). Brain tissue oxygen monitoring in traumatic brain injury and major trauma: outcome analysis of a brain tissue oxygen-directed therapy. J Neurosurg 111, 672-82.

Naruse, S., Y. Horikawa, et al. (1982). Proton nuclear magnetic resonance studies on brain edema. J Neurosurg 56, 747-52.

Noguchi, C. T., P. Asavaritikrai, et al. (2007) Role of erythropoietin in the brain. 64,159-71.

Nortje, J. and A. K. Gupta (2006). The role of tissue oxygen monitoring in patients with acute brain injury. Br J Anaesth 97, 95-106.

Nwaigwe, C. I., M. A. Roche, et al. (2000). Effect of hyperventilation on brain tissue oxygenation and cerebrovenous PO2 in rats. Brain Res 868, 150-6.

Oddo, M., J. M. Levine, et al. (2011). Brain hypoxia is associated with short-term outcome after severe traumatic brain injury independently of intracranial hypertension and low cerebral perfusion pressure. Neurosurgery 69,1037-45; discussion 1045.

Olesen, J., A. Gustavsson, et al. (2012). The economic cost of brain disorders in Europe. Eur J Neurol 19, 155-62.

Oshio, K., D. K. Binder, et al. (2005). Expression of the aquaporin-1 water channel in human glial tumors. Neurosurgery 56, 375-81; discussion 375-81.

Ozturk, E., S. Demirbilek, et al. (2005). Antioxidant properties of propofol and erythropoietin after closed head injury in rats. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 29, 922-7.

Papadopoulos, M. C. and A. S. Verkman (2007). Aquaporin-4 and brain edema. Pediatr Nephrol 22, 778-84.

Park, E., J. D. Bell, et al. (2008). Traumatic brain injury: can the consequences be stopped? CMAJ 178, 1163-70.

Payen, J. F., B. Fauvage, et al. (2003). L'œdème cérébral par lésion de la barrière hématoencéphalique : mécanismes et diagnostic. Ann Fr Anesth Reanim 22, 220-5.

Payen, J. F., Fauvage B., Lavagne P, Falcon D. (2001). Traitement de l'oedème cérébral. Conférence d'actualisation Sfar 2001 Les essentiels, ed. E. SAS.

Pedersen, M. O., A. Larsen, et al. (2009). Cell death in the injured brain: roles of metallothioneins. Prog Histochem Cytochem 44, 1-27.

Pennings, F. A., P. R. Schuurman, et al. (2008). Brain tissue oxygen pressure monitoring in awake patients during functional neurosurgery: the assessment of normal values. J Neurotrauma 25, 1173-7.

Ponce, L. L., J. C. Navarro, et al. (2012). Erythropoietin neuroprotection with traumatic brain injury. Pathophysiology. Sous presse.

Price, C. D., Z. Yang, et al. (2010). Effect of continuous infusion of asialoerythropoietin on short-term changes in infarct volume, penumbra apoptosis and behaviour following middle cerebral artery occlusion in rats. Clin Exp Pharmacol Physiol 37, 185-92.

Rademakers, S. E., J. Lok, et al. (2011). Metabolic markers in relation to hypoxia; staining patterns and colocalization of pimonidazole, HIF-1alpha, CAIX, LDH-5, GLUT-1, MCT1 and MCT4. BMC Cancer 11, 167.

Rao, K. V., A. R. Jayakumar, et al. (2010). Aquaporin-4 in manganese-treated cultured astrocytes. Glia 58, 1490-9.

Rasey, J. S., Z. Grunbaum, et al. (1987). Characterization of radiolabeled fluoromisonidazole as a probe for hypoxic cells. Radiat Res 111, 292-304.

Ringel, F., R. C. Chang, et al. (2000). Contribution of anion transporters to the acidosis-induced swelling and intracellular acidification of glial cells. J Neurochem 75, 125-32.

Robertson, C. S., L. Cherian, et al. (2011). Neuroprotection with an erythropoietin mimetic peptide (pHBSP) in a model of mild traumatic brain injury complicated by hemorrhagic shock. J Neurotrauma 29, 1156-66.

Rosenthal, G., J. C. Hemphill, 3rd, et al. (2008). Brain tissue oxygen tension is more indicative of oxygen diffusion than oxygen delivery and metabolism in patients with traumatic brain injury. Crit Care Med 36, 1917-24.

Rugg-Gunn, F. J., M. R. Symms, et al. (2001). Diffusion imaging shows abnormalities after blunt head trauma when conventional magnetic resonance imaging is normal. J Neurol Neurosurg Psychiatry 70, 530-3.

Saadoun, S., M. J. Tait, et al. (2009). AQP4 gene deletion in mice does not alter blood-brain barrier integrity or brain morphology. Neuroscience 161, 764-72.

Sakanaka, M., T. C. Wen, et al. (1998). In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 4635-40.

Santhanam, A. V., L. A. Smith, et al. (2005). Role of endothelial NO synthase phosphorylation in cerebrovascular protective effect of recombinant erythropoietin during subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm. Stroke 36, 2731-7.

Schaefer, P. W., T. A. Huisman, et al. (2004). 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 233, 58-66.

Schmidt, R. E., K. G. Green, et al. (2008). Erythropoietin and its carbamylated derivative prevent the development of experimental diabetic autonomic neuropathy in STZ-induced diabetic NOD-SCID mice. Exp Neurol 209, 161-70.

Schwarcz, A., Z. Berente, et al. (2002). Fast in vivo water quantification in rat brain oedema based on T(1) measurement at high magnetic field. Acta Neurochir (Wien) 144, 811-5; discussion 815-6.

Schwarzmaier, S. M., S. W. Kim, et al. (2010). Temporal profile of thrombogenesis in the cerebral microcirculation after traumatic brain injury in mice. J Neurotrauma 27, 121-30.

Shanmuganathan, K., R. P. Gullapalli, et al. (2004). Whole-brain apparent diffusion coefficient in traumatic brain injury: correlation with Glasgow Coma Scale score. AJNR Am J Neuroradiol 25, 539-44.

Shenaq, M., H. Kassem, et al. (2012). Neuronal damage and functional deficits are ameliorated by inhibition of aquaporin and HIF1alpha after traumatic brain injury (TBI). J Neurol Sci 323, 134-40.

Shigemori, Y., Y. Katayama, et al. (2006). Matrix metalloproteinase-9 is associated with blood-brain barrier opening and brain edema formation after cortical contusion in rats. Acta Neurochir Suppl 96, 130-3.

Siemonsen, S., T. Fitting, et al. (2012). Visual Assessment of Magnetic Resonance Imaging Perfusion Lesions in a Large Patient Group. Clin Neuroradiol. 22, 305-13.

Singh, I. N., P. G. Sullivan, et al. (2006). Time course of post-traumatic mitochondrial oxidative damage and dysfunction in a mouse model of focal traumatic brain injury: implications for neuroprotective therapy. J Cereb Blood Flow Metab 26, 1407-18.

Siren, A. L., K. Radyushkin, et al. (2006). Global brain atrophy after unilateral parietal lesion and its prevention by erythropoietin. Brain 129, 480-9.

Spees, W. M., D. A. Yablonskiy, et al. (2001). Water proton MR properties of human blood at 1.5 Tesla: magnetic susceptibility, T(1), T(2), T*(2), and non-Lorentzian signal behavior. Magn Reson Med 45, 533-42.

Spiotta, A. M., M. F. Stiefel, et al. (2010). Brain tissue oxygen-directed management and outcome in patients with severe traumatic brain injury. J Neurosurg 113, 571-80.

Springborg, J. B., C. Moller, et al. (2007). Erythropoietin in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage: a double blind randomised clinical trial. Acta Neurochir (Wien) 149, 1089-101; discussion 1101.

Stiefel, M. F., A. Spiotta, et al. (2005). Reduced mortality rate in patients with severe traumatic brain injury treated with brain tissue oxygen monitoring. J Neurosurg 103, 805-11.

Stocchetti, N., K. I. Penny, et al. (2001). Intensive care management of head-injured patients in Europe: a survey from the European brain injury consortium. Intensive Care Med 27, 400-6.

Sun, Y., J. W. Calvert, et al. (2005). Neonatal hypoxia/ischemia is associated with decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration. Stroke 36, 1672-8.

Tagliaferri, F., C. Compagnone, et al. (2006). A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. Acta Neurochir (Wien) 148, 255-68; discussion 268.

Takeyama, T., G. Takemura, et al. (2012). Asialoerythropoietin, a nonerythropoietic derivative of erythropoietin, displays broad anti-heart failure activity. Circ Heart Fail 5, 274-85.

Talving, P., T. Lustenberger, et al. (2010). Erythropoiesis stimulating agent administration improves survival after severe traumatic brain injury: a matched case control study. Ann Surg 251, 1-4.

Teasdale, G. and B. Jennett (1974). Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. Lancet 2, 81-4.

Thavasothy, M., M. Broadhead, et al. (2002). A comparison of cerebral oxygenation as measured by the NIRO 300 and the INVOS 5100 Near-Infrared Spectrophotometers. Anaesthesia 57, 999-1006.

Thornhill, S., G. M. Teasdale, et al. (2000). Disability in young people and adults one year after head injury: prospective cohort study. BMJ 320, 1631-5.

Tropres, I., S. Grimault, et al. (2001). Vessel size imaging. Magn Reson Med 45, 397-408.

Tropres, I., L. Lamalle, et al. (2004). Vessel size imaging using low intravascular contrast agent concentrations. MAGMA 17, 313-6.

Tsai, P. T., J. J. Ohab, et al. (2006). A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. J Neurosci 26, 1269-74.

Tseng, M. Y., P. J. Hutchinson, et al. (2009). Acute systemic erythropoietin therapy to reduce delayed ischemic deficits following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a Phase II randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Clinical article. J Neurosurg 111, 171-80.

Ueba, H., M. Brines, et al. (2010). Cardioprotection by a nonerythropoietic, tissue-protective peptide mimicking the 3D structure of erythropoietin. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 14357-62.

Um, M. and H. F. Lodish (2006). Antiapoptotic effects of erythropoietin in differentiated neuroblastoma SH-SY5Y cells require activation of both the STAT5 and AKT signaling pathways. J Biol Chem 281, 5648-56.

Unterberg, A. W., J. Stover, et al. (2004). Edema and brain trauma. Neuroscience 129, 1021-9.

Valable, S., G. Francony, et al. (2010). 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 30, 361-9.

van den Brink, W. A., H. van Santbrink, et al. (2000). Brain oxygen tension in severe head injury. Neurosurgery 46, 868-76; discussion 876-8.

Velly, L., L. Pellegrini, et al. (2010). Erythropoietin 2nd cerebral protection after acute injuries: a double-edged sword? Pharmacol Ther 128, 445-59.

Verdonck, O., H. Lahrech, et al. (2007). Erythropoietin protects from post-traumatic edema in the rat brain. J Cereb Blood Flow 27, 1369-76.

Verkman, A. S. (2009). Knock-out models reveal new aquaporin functions. Handb Exp Pharmacol, 359-81.

Verweij, B. H., J. P. Muizelaar, et al. (2000). Impaired cerebral mitochondrial function after traumatic brain injury in humans. J Neurosurg 93, 815-20.

Villa, P., J. van Beek, et al. (2007). Reduced functional deficits, neuroinflammation, and secondary tissue damage after treatment of stroke by nonerythropoietic erythropoietin derivatives. J Cereb Blood Flow Metab 27, 552-63.

Wang, L., Z. Zhang, et al. (2004). Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. Stroke 35, 1732-7.

Wang, L., Z. G. Zhang, et al. (2006). Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 secreted by erythropoietin-activated endothelial cells promote neural progenitor cell migration. J Neurosci 26, 5996-6003.

Wang, L. V. (2008). Prospects of photoacoustic tomography. Med Phys 35, 5758-67.

Wang, Y., Z. G. Zhang, et al. (2007). Post-ischemic treatment with erythropoietin or carbamylated erythropoietin reduces infarction and improves neurological outcome in a rat model of focal cerebral ischemia. Br J Pharmacol 151, 1377-84.

Warnecke, C., Z. Zaborowska, et al. (2004). Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells. FASEB J 18, 1462-4.

Werner, C. and K. Engelhard (2007). Pathophysiology of traumatic brain injury. Br J Anaesth 99, 4-9.

Xenocostas, A., W. K. Cheung, et al. (2005). The pharmacokinetics of erythropoietin in the cerebrospinal fluid after intravenous administration of recombinant human erythropoietin. Eur J Clin Pharmacol 61,189-95.

Xiong, Y., M. Chopp, et al. (2009). Erythropoietin improves brain mitochondrial function in rats after traumatic brain injury. Neurol Res 31, 496-502.

Xiong, Y., D. Lu, et al. (2008). Effects of erythropoietin on reducing brain damage and improving functional outcome after traumatic brain injury in mice. J Neurosurg 109, 510-21.

Xiong, Y., A. Mahmood, et al. (2008). Histological and functional outcomes after traumatic brain injury in mice null for the erythropoietin receptor in the central nervous system. Brain Res 1230, 247-57.

Xiong, Y., A. Mahmood, et al. (2010). Erythropoietin improves histological and functional outcomes after traumatic brain injury in mice in the absence of the neural erythropoietin receptor. J Neurotrauma 27, 205-15.

Xiong, Y., A. Mahmood, et al. (2011). 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 114, 549-59.

Xu, X., Z. Cao, et al. (2009). Carbamylated erythropoietin protects the myocardium from acute ischemia/reperfusion injury through a PI3K/Akt-dependent mechanism. Surgery 146, 506-14.

Yablonskiy, D. A. and E. M. Haacke (1994). Theory of NMR signal behavior in magnetically inhomogeneous tissues: the static dephasing regime. Magn Reson Med 32, 749-63.

Yamasaki, M., H. K. Mishima, et al. (2005). Neuroprotective effects of erythropoietin on glutamate and nitric oxide toxicity in primary cultured retinal ganglion cells. Brain Res 1050, 15-26.

Yang, Q. X., G. D. Williams, et al. (1998). Removal of local field gradient artifacts in T2*-weighted images at high fields by gradient-echo slice excitation profile imaging. Magn Reson Med 39, 402-9.

Yatsiv, I., N. Grigoriadis, et al. (2005). Erythropoietin is neuroprotective, improves functional recovery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury. FASEB J 19(12): 1701-3.

Yu, X., J. J. Shacka, et al. (2002). Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. Development 129, 505-16.

Yu, Y. P., Q. Q. Xu, et al. (2005). Intranasal recombinant human erythropoietin protects rats against focal cerebral ischemia. Neurosci Lett 387, 5-10.

Zauner, A., R. Bullock, et al. (1995). Brain oxygen, CO2, pH, and temperature monitoring: evaluation in the feline brain. Neurosurgery 37, 1168-76; discussion 1176-7.

Zhang, X., Y. Chen, et al. (2005). Bench-to-bedside review: Apoptosis/programmed cell death triggered by traumatic brain injury. Crit Care 9, 66-75.

Zhu, X. H., N. Zhang, et al. (2005). In vivo 17O NMR approaches for brain study at high field. NMR Biomed 18, 83-103.