



HAL
open science

Modélisation du traumatisme crânien sévère chez le rat par la technique de la percussion latérale de fluide : effet sur le bien-être animal et évolution temporelle des séquelles

Clélia Allieux

► To cite this version:

Clélia Allieux. Modélisation du traumatisme crânien sévère chez le rat par la technique de la percussion latérale de fluide : effet sur le bien-être animal et évolution temporelle des séquelles. Neurosciences. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1113 . tel-03815111

HAL Id: tel-03815111

<https://theses.hal.science/tel-03815111v1>

Submitted on 14 Oct 2022

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

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



N° d'ordre NNT : 2021LYSE1113

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

**Ecole Doctorale N° 476
(Neurosciences et Cognition)**

Spécialité de doctorat : Neurosciences

Soutenue publiquement le 30/06/2021, par :

Clélia ALLIOUX

Modélisation du traumatisme crânien sévère chez le rat par la technique de la percussion latérale de fluide : effet sur le bien-être animal et évolution temporelle des séquelles

Devant le jury composé de :

Jérôme BADAUT	DR, Université de Bordeaux	Rapporteur
Pierre BOUZAT	PU-PH, Université de Grenoble Alpes	Rapporteur
A. Karyn JULLIARD	PU, Université Claude Bernard Lyon 1	Présidente
Sophie PICAVET	Vétérinaire, Institut de Recherches Servier	Examinatrice
Stéphane MARINESCO	CR, Université Claude Bernard Lyon 1	Directeur de thèse
Baptiste BALANCA	Chef de clinique assistant hospitalier, HCL	Invité

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETT

Résumé

Le traumatisme crânien (TC) sévère est une pathologie à part entière distincte du TC léger ou modéré, qui induit une grande variété de phénomènes pathophysiologiques. Les lésions neurologiques résultent de l'agression mécanique initiale, et se développent au cours des heures, des jours voire des mois suivant le TC par des processus appelés lésions cérébrales secondaires. Sans intervention clinique, des séquelles sensorielles, motrices, cognitives ou neurologiques peuvent s'installer, provoquant le décès du patient ou des handicaps de long terme. Une partie de ces mécanismes secondaires reposent sur des défaillances systémiques d'origine respiratoire, cardio-vasculaire ou immunitaire. La modélisation des mécanismes pathophysiologiques mis en jeu par le TC sévère est importante pour comprendre l'évolution des lésions et ne peut se faire qu'*in vivo*, chez l'animal. L'objectif de ces travaux de thèse est la mise en place et la caractérisation d'un modèle de TC sévère par percussion latérale de fluide chez des rats mâles et femelles. Dans un premier temps, une valve pneumatique a été utilisée pour tenter d'induire le TC sévère de façon plus reproductible avec un dispositif portable. Une seconde partie met l'accent sur la quantification quotidienne du bien-être animal dans le modèle de TC sévère à l'aide d'une grille de score. Ceci permet de raffiner le modèle, d'estimer l'état général du rat et de limiter l'introduction de biais scientifiques causés par un mal-être général, une souffrance ou un inconfort post-TC. Finalement, l'évolution temporelle des lésions et des séquelles post-traumatiques comportementales et neurologiques a été mesurée jusqu'à 160 jours post-TC. Ainsi, nous avons montré au travers de ces travaux, une dégradation transitoire du bien-être animal sur les deux semaines après l'induction du TC. De plus, des altérations comportementales et anatomiques étaient visibles dès le deuxième jour avec une installation d'un état anxieux et de déficits de mémoire 115 jours après le TC. Des disparités entre les mâles et les femelles ont été observées avec une tendance à une sévérité plus marquée chez les femelles. L'ensemble de ces résultats permet de mieux définir le TC sévère chez l'animal ainsi que ses conséquences éthiques, neurologiques et comportementales. Il permettra d'étudier les mécanismes pathophysiologiques du TC sévère ainsi que de nouvelles approches thérapeutiques au stade préclinique de façon plus spécifique.

Mots clés : Traumatisme crânien sévère, percussion latérale de fluide, rats, bien-être animal, séquelles, long-terme.

Abstract

Severe traumatic brain injury (TBI) is a specific pathology, that should be distinguished from mild and moderate TBI, and induces a great variety of pathophysiological mechanisms. Neurological injuries result from the initial mechanical insult, and develop over hours, days or months following TBI, involving biological mechanisms termed « secondary injuries ». Without appropriate medical intervention, sensory, motor and neurological sequelae can persist, and induce long-term handicap or death. Such secondary injuries involve at least in part systemic deficits from respiratory, cardiovascular or immunological origin. Modelling the pathophysiological mechanisms triggered by severe TBI is important to understand lesion progression, and therefore, cannot be accurately performed without the use of live laboratory animals. The goal of this thesis is to develop and characterize a severe TBI model in male and female rats, relying on the lateral fluid percussion technique. Firstly, a pneumatic valve was used to attempt inducing severe TBI in a more reproducible manner, using portable equipment. Secondly, we quantified daily animal welfare after severe TBI using a specific scoresheet. This approach allowed estimating the general well-being of the animals, and limiting possible methodological biases related to poor animal welfare. Finally, the temporal evolution of neurological lesions and behavioral sequelae was characterized up to 160 days after severe TBI. We showed that animal welfare was impacted during a transitory period lasting less than two weeks. Anatomical and behavioral deficits were observed as soon as two days, while anxiety and memory deficits persisted 110 days after severe TBI. Sexual disparities included a tendency for more severe behavioral consequences in females. Altogether, these results allow for a more precise definition of severe TBI in animals, as well as a better estimation of its ethical, neurological and behavioral consequences. They will allow to study with more specificity the pathological mechanisms triggered by severe TBI, as well as possible new therapies at a preclinical stage.

Key words: Severe traumatic brain injury, lateral fluid percussion, rats, welfare, sequelae, long-term.

Remerciements

Mes remerciements vont aux rapporteurs de cette thèse, le Dr. Jérôme BADAUT et le Pr. Pierre BOUZAT, de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant et en prenant le temps d'examiner ainsi que d'évaluer ce travail. Je souhaite également remercier la Dr. Sophie PICAUVET pour ses conseils sur le bien-être animal, d'avoir accepté d'être membre de mon jury et d'avoir considéré mon travail. Je tiens également à remercier la Pr. Andrée Karyn JULLIARD d'avoir accepté d'être présidente de ce jury ainsi que pour son regard sur mes travaux de recherche.

À mon directeur de thèse, le Dr. Stéphane MARINESCO pour son encadrement au cours de ces quatre ans et demi de doctorat. Je te remercie pour ta disponibilité, ton écoute et ta bienveillance, surtout dans les moments difficiles. Grâce à toi, j'ai pu réaliser cette thèse, qui a été entouré de nombreux événements inopportuns et nous a donné à réfléchir. Mais avec du recul, cela m'a permis d'aller au-delà de mes limites et d'acquérir de l'endurance. Cette thèse fût une aventure surprenante, sinueuse, éprouvante, mais surtout, enrichissante.

Je désire également remercier le Dr Laurent BEZIN et le Pr. Sylvain RHEIMS de m'avoir accueilli au sein de l'équipe TIGER, pour vos remarques et vos expertises. Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe, et en particulier Nadia et Wanda, merci pour la découverte des tests de comportements et votre aide pour les immunohistochimies.

Je remercie le Dr. Baptiste BALANCA pour ton temps passé à m'expliquer les statistiques, tes conseils sur la réalisation de mon projet de thèse et ta séance improvisée de relaxation/méditation avant mon oral au congrès de BRAIN & BRAIN PET.

Anne MEILLER, un énorme merci d'avoir partagé ces années de thèse. Quelques mots ne suffiront pas à te montrer ma gratitude pour tous ces moments passés. Tu as été présente pour moi tout du long, à m'écouter, m'épauler, me soutenir et me reconforter, mais aussi à me former sur les biocapteurs et à m'aiguiller sur mes réflexions. J'ai apprécié nos conversations, parfois philosophiques.

Je remercie chaleureusement mes co-équipières Laëtitia, Mélodie et Ellora pour votre aide lors des expériences, des chirurgies et, tout simplement, des moments passés avec moi. Merci pour votre tranquillité et votre bonne humeur. Une partie de ces travaux ne serait pas réalisée sans l'aide de mes stagiaires, Sandra pour les manips de bleu d'Evans, Jenya pour l'IRM, Fatima pour le comportement et Flavien pour les immunohistologies. À une ancienne collègue, Mathilde, et un ancien doctorant, Charles, je vous remercie pour votre aide lors de mes expérimentations et de votre soutien. Sans oublier les « petites boules de poils », sans qui, cette thèse serait inexistence.

Je souhaite remercier les membres de l'animalerie de Rockefeller et du Neurocampus ; ceux du plateau technique d'Animage du CERMEP, notamment Radu pour l'IRM, Jean-Baptiste et Marco, ainsi que le personnel du CIQLE.

Je tiens à remercier les personnes qui m'ont entouré lors de mes premiers pas dans la recherche au cours de mon stage de M1 : Françoise, Pascale et le Dr. Armand SAVIOZ de l'équipe NEURAD (Hôpitaux Universitaires de Genève). Je me souviens en particulier de notre dernière conversation où tu m'encourageais à poursuivre en thèse et qu'à cette époque, je n'étais pas certaine

de m'y diriger et d'y arriver. Je remercie les membres de l'équipe Cervoxy (Unité ISTCT, Université de Caen Normandie) qui m'ont accueilli en tant qu'ingénieure d'étude avant la thèse. Cette expérience m'a permis d'acquérir certaines bases utiles pour ce projet doctoral. Je souhaite également remercier Emmanuelle Courtiol qui m'a donné l'opportunité d'animer les TP de physiologie animale à l'IUT Lyon 1, et donc d'entrevoir le monde de l'enseignement.

Cette thèse ne serait rien sans les instants de la vie quotidienne et de détente.

Arthur, Yannick et Damien, merci d'avoir développé mon côté Geek et de Terminator. En espérant continuer à « botter des derrières » avec vous sur n'importe quel jeu (ou presque !). Un merci pour la troupe du post-confinement pour ces moments Skype et ce week-end de retrouvaille.

Merci aux lyonnais Maryline, Anthony, Nicolas et Alexandre, pour les moments de détente au parc, chez l'un d'entre nous ou à l'autre bout de la France, avec un nécessaire apéro autour d'un jeu de société ou après une randonnée. Vivement qu'on reprenne ces activités !

Merci aux Normands pour ces week-ends de parenthèses qui m'ont souvent permis de me ressourcer. Chloé et Olivier, cela fait toujours plaisir de vous revoir pour ces moments d'évasions. Merci à Zouzou et à Marie, avec qui le temps s'est arrêté depuis 15 ans. À la normande-belge, Audrey, je n'étais plus vraiment disponible pour les projets de voyage mais on pourra bientôt les reprendre ! Merci pour le coup de main de la relecture. Je te remercie d'avoir été là malgré la distance. Gaëlle, je te remercie pour ces moments universitaires passés avec toi. C'est fou le chemin que nous avons parcouru, je suis fière de nous. Elisa, je te remercie énormément pour ces nombreuses heures aux téléphones, ces moments de thérapies, d'encouragement, de soutien, de rire et de surprise peu importe où l'on se retrouve. Il me est difficile de te montrer ô combien tu m'as aidé durant cette thèse.

Je voudrais remercier ma famille, même si je ne parlais pas beaucoup de ma thèse, je savais que vous étiez là si j'en avais besoin, et vous me l'avez montré au cours de ces derniers mois. J'espère qu'avec ce manuscrit vous avez pu voir un aperçu de ce qui m'a occupé pendant ces quatre dernières années. Un remerciement plutôt particulier à Opaline pour les séances improvisées de ronronthérapie lors de l'écriture de ce manuscrit.

Alexis, probablement celui qui a le plus de mérite. Tu as été présent à chaque instant, à me soutenir, m'encourager, m'épauler et voir le meilleur en moi. Tu as fait preuve d'un courage inestimable en partageant ces années de thèse avec moi, à m'écouter et à toujours positiver même dans les moments difficiles. Merci pour toutes les petites attentions au quotidien, de m'avoir suivi dans ma folie. Merci pour ces moments passés et à venir.

Une agréable lecture aux curieux de la Science !

TABLE DES MATIERES

TABLES DES MATIERES	1
LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX	9
LISTE DES ABREVIATIONS	11
AVANT-PROPOS	13
INTRODUCTION	17
I. Traumatisme crânien	19
I.1. Définition.....	19
I.2. Brève histoire sur le traumatisme crânien.....	20
I.3. Epidémiologie et étiologie du traumatisme crânien.....	22
I.4. Classification du traumatisme crânien.....	26
I.5. Résumé.....	35
II. Physiopathologie du traumatisme crânien	36
II.1. Lésions primaires.....	37
II.2. Lésions secondaires.....	44
II.3. Prise en charge hospitalière.....	65
II.4. Résumé.....	68
III. Séquelles et symptômes post-traumatiques	69
III.1. Histoire et anatomie.....	69
III.2. Dysfonctionnements sensoriels.....	73
III.3. Dysfonctionnement moteur.....	75
III.4. Dysfonctionnements cognitifs.....	77
III.5. Troubles psychologiques.....	79
III.6. Troubles neurologiques.....	80
III.7. Impact social.....	83
III.8. Synthèse sur le traumatisme crânien sévère.....	84

IV. Modèles expérimentaux	86
IV.1. Modèles <i>in vitro</i>	86
IV.2. Histoire et éthique animale.....	90
IV.3. Modèles <i>in vivo</i>	92
IV.4. Evolution lésionnelle dans le modèle LFP	104
OBJECTIFS	111
MATERIELS ET METHODES GENERALS	115
I. Etudes menées	117
II. Les animaux	117
III. Protocole chirurgical	118
IV. Induction du traumatisme crânien sévère	120
V. Choix du groupe contrôle	122
VI. Suivi des paramètres vitaux lors de la chirurgie	123
VII. Contrôle de la sévérité du modèle	124
VII.1. Etude sans réveil.....	124
VII.2. Etudes avec réveil.....	124
RESULTATS	131
I. Raffinement du modèle de traumatisme crânien	133
I.1. Objectif	133
I.2. Matériels et méthodes	134
I.3. Résultats	141
I.4. Conclusion	156
II. Développement d'une grille d'évaluation du bien-être animal spécifique pour le modèle de traumatisme crânien sévère chez le rat	157
II.1. Avant-propos de article	157
II.2. Article	159
II.3. Informations supplémentaires de l'article	174

III. Suivi longitudinal des performances comportementales des rats soumis à un traumatisme crânien sévère	179
III.1. Introduction.....	179
III.2. Matériels et méthodes	181
III.3. Résultats	190
III.4. Discussion	204
DISCUSSION GENERALE	209
I. Raffinement du modèle de percussion latérale de fluide	211
II. Mise en place d’une grille de bien-être animale spécifique	213
III. Caractérisation longitudinale du traumatisme crânien sévère chez le rat	214
III.1. Inclusion et sévérité du traumatisme crânien.....	214
III.2. Epilepsie post-traumatique	215
III.3. Déficits moteurs	216
III.4. Déficits cognitifs	217
III.5. Comportement anxieux.....	218
III.6. La variable sexuelle dans le traumatisme crânien	218
III.7. Anomalies cérébrales observées par imagerie et perceptives.....	220
IV. Conclusion générale	221
BIBLIOGRAPHIE	223
ANNEXES	251
Annexe 1 – Chapitre	253
Annexe 2 – Curriculum Vitæ	295

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Le crâne d'un enfant datant du Paléolithique ayant eu un traumatisme crânien sévère.	20
Figure 2. Carte d'incidence du traumatisme crânien dans le monde en 2016.	23
Figure 3. Incidences du traumatisme crânien global.	25
Figure 4. Illustration des mécanismes physiques provoquant un traumatisme crânien.	27
Figure 5. Hétérogénéités des séquelles pathologiques des traumatismes crâniens sévères.	30
Figure 6. Représentation des blessures anatomopathologiques.	31
Figure 7. Mécanismes évolutifs impliqués dans les lésions cérébrales après un traumatisme crânien.	37
Figure 8. Représentation de la boîte crânienne.	38
Figure 9. Réseau vasculaire cérébral humain.	40
Figure 10. Unité vasculaire et barrière hémato-encéphalique (BHE).	41
Figure 11. Mécanismes induisant les lésions axonales diffuses.	43
Figure 12. Composantes du traumatisme crânien et importance des différents mécanismes physiopathologiques.	44
Figure 13. Autorégulation du débit sanguin cérébral chez un individu sain et un patient avec un traumatisme crânien.	46
Figure 14. Représentation schématique des événements moléculaires dans la zone de pénombre post-traumatique expliquant hypothétiquement l'hémorragie retardée.	52
Figure 15. Voies de signalisations de l'apoptose cellulaire.	59
Figure 16. Résumé de trois cascades de signalisation clés qui peuvent faire le lien entre l'inflammation et l'épileptogénèse.	62
Figure 17. Caractérisation électrophysiologique de la dépolarisation corticale envahissante et des modifications ioniques associées.	64
Figure 18. Le cas de Phineas Gage (1823 - 1860) ayant eu un traumatisme crânien pénétrant.	70
Figure 19. Séquelles retrouvées après un traumatisme crânien suivant les structures cérébrales endommagées.	71
Figure 20. Représentation de certaines fibres de la substance blanche et de structures sous-corticales.	73

Figure 21. Risque relatif d'épilepsie après un traumatisme crânien.	82
Figure 22. Représentation schématique de l'évolution temporelle des lésions et des séquelles après un traumatisme crânien sévère.	85
Figure 23. Exemple d'un modèle de compression d'une culture organotypique en 3D.....	87
Figure 24. Modèle de lésion par étirement cellulaire.....	89
Figure 25. Modèle du lâcher de poids de Marmarou.	94
Figure 26. Modèle d'accélération rotationnelle.	94
Figure 27. Modèle d'explosion.....	95
Figure 28. Modèle de lâcher de poids de Feeney.....	96
Figure 29. Modèle par pénétration balistique.	97
Figure 30. Modèle d'impact cortical contrôlé.....	98
Figure 31. Modèle de percussion latérale de fluide..	100
Figure 32. Vue coronale de coupes histologiques de cerveau de deux modèles de traumatisme crânien sévère chez le rat.....	103
Figure 33. Protocole du déroulement des études sur la caractérisation du traumatisme crânien sévère chez le rat.	117
Figure 34. Illustrations de la zone d'induction du traumatisme crânien.	120
Figure 35. Représentation schématique du dispositif de percussion latérale de fluide (LFP).....	121
Figure 36. Profils d'ondes de choc produites à 3,8 atm par l'appareil à percussion latérale de fluide et mesurées par le transducteur.	122
Figure 37. Systèmes de mesures non-invasifs des paramètres vitaux.....	124
Figure 38. Capteur de pression artérielle.....	134
Figure 39. Appareil à valve pneumatique.	136
Figure 40. Suivi du débit sanguin cérébral et électrocorticographie.	139
Figure 41. Calibration du capteur de pression artérielle.	141
Figure 42. Profil de l'onde de choc induite à 3 et 3,8 atm par l'appareil de percussion latérale de fluide conventionnel.....	142
Figure 43. Observation de l'onde de choc induite par le dispositif LFP conventionnel avec ou sans tubulure reliant le capteur PA et le transducteur LFP.....	143
Figure 44. Caractérisation de l'onde de choc induite par la valve pneumatique..	145

Figure 45. Profils des ondes de choc lors de la calibration pré-traumatique et du TC.....	149
Figure 46. Changement rapide des paramètres physiologiques après un traumatisme crânien.....	154
Figure 47. Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique 6 h post-traumatique..	155
Figure 48. Représentation du dispositif rotarod.....	184
Figure 49. Paramètres étudiés lors du protocole du GaitLab..	185
Figure 50. Dispositifs pour mesurer l'anxiété des rats après un traumatisme crânien..	187
Figure 51. Inclusion des rats et sévérité du traumatisme crânien.....	192
Figure 52. Illustration des images acquises par IRM pondérées en T6 sur 60 jours après un traumatisme crânien sévère chez le rat.....	195
Figure 53. Marquages des neurones 160 jours après l'induction d'un traumatisme crânien sévère chez le rat..	195
Figure 54. Effet du traumatisme crânien chez les rats femelles et mâles pour le score neurologique sur 160 jours.....	196
Figure 55. Diminution de la motricité les premiers jours post-traumatisme crânien..	198
Figure 56. Analyse de la marche chez les rats ayant un traumatisme crânien sévère (TC).....	200
Figure 57. Apprentissage et rétention de la mémoire spatiale à 115 jours après le traumatisme crânien (TC).	201
Figure 58. Effet du traumatisme crânien sévère sur l'expression d'un comportement anxieux.....	203

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. L'échelle de Glasgow.....	28
Tableau II. Le score de Marshall.....	32
Tableau III. <i>Glasgow Outcome Scale</i> (GOS) et son étendu (GOSE) avec les niveaux inférieurs (Inf.) et supérieurs (Sup.).....	33
Tableau IV. Description et sévérité du traumatisme crânien.....	35
Tableau V. Agressions cérébrales secondaires d'origine systémique (ACSOS) chez l'adulte.....	49
Tableau VI. Résumé des caractéristiques des modèles animaux de traumatisme crânien.....	102
Tableau VII. Échelle de coma pour rat de Tübingen-Boston.....	126
Tableau VIII. Score de gravité neurologique.....	128
Tableau IX. Valeurs des différentes méthodes utilisées pour contrôler la pression pour une atmosphère.....	135
Tableau X. Les cinq conditions d'induction du traumatisme crânien testées chez le rat anesthésié.....	146
Tableau XI. Séquelles physiologiques après l'induction du traumatisme crânien chez le rat.....	152
Tableau XII. Protocole du labyrinthe aquatique (<i>Morris Water Maze</i>) à J115 après le traumatisme crânien.....	186
Tableau XIII. Analyses multiples de Bonferroni pour les scores neurologiques chez les animaux traumatisés sévères.....	197

LISTE DES ABREVIATIONS

ACRM : *American Congress of rehabilitation Medicine*

ACSOS : Agressions cérébrales secondaires d'origine systémique

AIS : *Abbreviated injury scale*

AOC : *Alteration of consciousness*

ATP : Adénosine triphosphate

AVC : Accident vasculaire cérébral

BEA : Bien-être animal

BHE : Barrière hémato-encéphalique

CDC : *Centers for Disease Control and Prevention*

CIM : Classification internationale des maladies

CRASH : *Corticoid Randomisation After Significant Head injury*

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DCE : Dépolarisation corticale envahissante

DSC : Débit sanguin cérébral

DTI : *Diffusion tensor images*

EcoG : Électrocorticographie

EEG : Électroencéphalographie

FLAIR : *Fluid Attenuated Inversion Recovery*

GCS : *Glasgow Coma Scale*

GOS : *Glasgow Outcome Scale*

GOSE : *Glasgow Outcome Scale-Extended*

HIC : Hypertension intracrânienne

HPT : Hydrocéphalie post-traumatique

HSA : Hémorragie sous-arachnoïdienne

HSD : Hématome sous-dural

IL : Interleukine

IP : Intrapéritonéale

IMPACT : *International Mission on Prognosis and Analysis of Clinical Trials*

IRM : Imagerie par résonance magnétique

ISS : *Injury Severity Score*

LAD : Lésion axonale diffuse

LCR : Liquide céphalorachidien

LFP : Percussion latérale de fluide (*fluid lateral percussion*)

LOC : *Loss of consciousness*

MWM : *Morris Water Maze*

NeuN : *Neural nuclear protein*

NSS : *Neurological Severity Scale*

OMS : Organisation mondiale de la Santé

PA : Pression artérielle

PaO₂ : Pression artérielle d'oxygène

PaCO₂ : Pression partielle de dioxyde de carbone

PAM : Pression artérielle moyenne

PBS : *Phosphate buffered saline*

PFA : Paraformaldéhyde

PIC : Pression intracrânienne

PPC : Pression de perfusion cérébrale

PTA : *Posttraumatic amnesia*

PTE : *Post-traumatic epilepsy*

PtiO₂ : Pression tissulaire cérébrale en oxygène

ROS : *Reactive oxygen species*

SC : Sous-cutanée

TBI : *Traumatic brain injury*

TC : Traumatisme crânien

TDM : Tomodensitométrie

AVANT-PROPOS

Le traumatisme crânien (TC) englobe un ensemble hétérogène de troubles physiopathologiques avec une complexité lésionnelle variée tant sur le plan physique, physiologique et psychosocial, touchant des individus de tout genre et de tout âge. Le TC est l'un des principaux facteurs de décès et d'invalidités au niveau mondial. Il recouvre toutes les pathologies cérébrales ou les altérations des fonctions cérébrales consécutives à une force externe. Les lésions induites sont diverses et résultent non seulement de l'effet physique initial (lésions primaires) du TC, mais également de leur évolution et de l'apparition d'agressions cérébrales secondaires sur du court terme (les heures et les jours) ou du long terme (les mois et les années). La prévention du traumatisme crânien et de ses lésions primaires fait depuis longtemps l'objet d'une politique des pouvoirs publics visant à répandre l'utilisation de moyens de protection comme le casque ou la ceinture de sécurité. Cependant, une fois que le traumatisme a été infligé, l'anticipation de l'apparition et l'évolution des lésions secondaires présentent un enjeu majeur dans le soin et le suivi des patients. Différentes techniques sont utilisées en clinique pour surveiller et classer la sévérité du TC (léger, modéré et sévère) permettant l'aménagement d'une prise en charge ciblée, et l'établissement d'un pronostic chez les patients traumatisés. Le TC sévère nécessite un effort de recherche particulier, de par la gravité des séquelles encourues et par l'engagement du pronostic vital des patients, qui arrivent souvent en soins intensifs neurologiques dans un état comateux et avec des complications systémiques. Le TC sévère génère le plus fort taux de mortalité parmi les personnes traumatisées.

L'amélioration du suivi et du pronostic des patients traumatisés crâniens passe par un effort de recherche clinique et préclinique pour comprendre les mécanismes mis en jeu par cette pathologie et leurs conséquences. La modélisation des pathologies sur les animaux est une étape importante pour comprendre les différentes échelles physiologiques (génétique, moléculaire, cellulaire, tissulaire, etc.) et comportementales (désordre psychologique post-traumatique, physique, etc.) impliquées. L'importance du choix du modèle réside dans la reproductibilité des mécanismes délétères souhaités et dans leur sévérité. Ceci soulève en parallèle des questions tournées vers l'éthique animale, notamment le bien-être animal, ainsi que la transposabilité et la modélisation chez l'Homme.

L'introduction de ce manuscrit se focalisera dans un premier temps à développer l'épidémiologie et la classification du TC, notamment sévère. En deuxième et troisième parties, les différentes lésions et leurs évolutions longitudinales sur le court et le long terme seront abordées, jusqu'à l'installation des déficits. Et enfin, la dernière partie se centrera sur le panel des modèles utilisés en décrivant les avantages et les inconvénients de chacun et notamment sur le besoin de modèle pour le TC sévère.

Le premier objectif de cette thèse est d'introduire un modèle de TC sévère chez le rat par l'induction d'une onde de choc provenant soit d'une valve pneumatique, soit par un dispositif de percussion latérale de fluide. Le deuxième objectif est d'élaborer un suivi quotidien du bien-être animal pour un modèle sévère au regard des 3R (raffiner, réduire, remplacer). Pour finir, le dernier objectif est d'évaluer les agressions secondaires et leur installation à long terme.

INTRODUCTION

I. Traumatisme crânien

I.1. Définition

Le traumatisme crânien est un évènement induisant des lésions cérébrales acquises, c'est-à-dire survenant après la naissance. Le Centre pour le Contrôle et la Prévention des Maladies (*Centers for Disease Control and Prevention, CDC*) définit les lésions cérébrales traumatiques comme étant causées par une bosse, un coup, une secousse à la tête ou un choc pénétrant qui perturbe le fonctionnement cérébral normal. Ces altérations n'entraînent pas systématiquement un TC et la gravité est classée de légère, c'est-à-dire à un bref changement de l'état mental ou de conscience, à sévère avec une période d'inconscience ou d'amnésie prolongée (Faul & Coronado, 2015). Le terme général de traumatisme est associé à un transfert subit d'énergie dépassant les capacités de résistance du corps humain (Haddon Jr & Baker, 1981). Menon *et al.* (2010) ont élaboré une définition générale du TC comme étant une perturbation des fonctions cérébrales, ou la survenue d'une pathologie cérébrale causée à la suite d'une force mécanique externe soit par un impact direct sur la boîte crânienne d'un composant contondant ou pénétrant, soit par un phénomène d'accélération - décélération provoquant un état de conscience diminué ou altéré. Les définitions données par l'« *American Congress of Rehabilitation Medicine* » (ACRM) et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) se tournent principalement sur le spectre de gravité inférieur des TC, et diffèrent sur l'inclusion de l'état mental altéré. L'ACRM intègre toutes les altérations de l'état mental produites lors de l'accident, tandis que l'OMS se centre sur les contusions et la désorientation (Maas *et al.*, 2017). Dans la littérature, le TC englobe parfois les « blessures à la tête » (*head injury*) qui ne sont pas forcément associées à des déficits neurologiques, comme une simple lésion de l'os sans atteinte cérébrale. Les dommages résultants du TC sont complexes et multifactoriels avec des effets à court et/ou à long terme interférant sur le mode de vie du patient à différents niveaux : physique, cognitif, comportemental, émotionnel et social, et imposent un coût financier important à la société. Cependant chez certains patients, les séquelles traumatiques ne sont pas immédiatement visibles, c'est pourquoi cette pathologie est appelée « épidémie silencieuse » (Peeters *et al.*, 2015). À l'inverse, le TC sévère interfère fortement sur la vie du patient avec des conséquences invalidantes ou handicapantes sur plusieurs années, et parfois pouvant entraîner son décès.

I.2. Brève histoire sur le traumatisme crânien

Le plus ancien cas de TC modéré-sévère connu date du Paléolithique moyen, il y a plus de 100 000 ans. Une étude archéologique a reconstruit *post mortem* une image tridimensionnelle du crâne d'un adolescent de 12-13 ans (Coqueugniot et al., 2014). Les chercheurs ont observé une fracture par enfoncement de l'os préfrontal dû à un objet contondant, lorsque l'enfant avait 4-6 ans (**Figure 1**). L'impact subit aurait altéré la croissance cranio-encéphalique, avec des troubles de la personnalité et des séquelles neurologiques probablement liés aux lésions focales. Les fouilles de nombreuses sépultures ont révélé des crânes présentant des trépanations datant du Néolithique et du Paléolithique, dont certaines hypothétiquement réalisées dans un but thérapeutique et d'autres dans le cadre d'un rituel religieux (Chauvet et al., 2010; Dastugue, 1959).

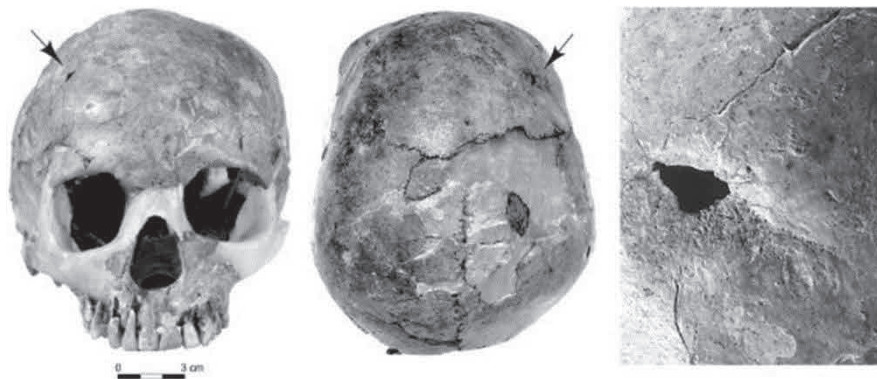


Figure 1. Le crâne d'un enfant datant du Paléolithique ayant eu un traumatisme crânien sévère. Lésion frontale (flèche) montrant une cicatrization de la ligne de fracture sur le côté droit du trou (astérisque noir) et les lignes visibles en-dessous et au-dessus correspondent à une altération *post mortem*. D'après (Coqueugniot et al., 2014).

Le papyrus Edwin Smith daté de 1 600 avant J. C., traduit en 1930 par l'archéologue James Henry Breasted, est l'un des plus anciens textes médicaux portant sur la chirurgie lors d'un TC. Ce document serait probablement une copie d'un manuscrit provenant de 3 000 - 2 500 avant J. C., décrivant des cas de TC survenus lors de guerres ou sur des chantiers de construction. Le texte montre pour chaque cas : un intitulé introductif, des symptômes significatifs considérés comme un examen clinique (anatomique et comportemental), un diagnostic et un traitement recommandé. Il contient également la première description du cerveau, de la dure-mère, du liquide céphalorachidien et classe 27 cas de TC suivant le type de fracture : linéaire et comminutive, avec ou sans dépression. Un regard sur le pronostic vital des individus traumatisés est apporté en annonçant son engagement lors d'un

enfouissement ou d'une embarrure, d'une déchirure durale ou encore d'une infection cérébrale (Bertullo, 2015; Dastugue, 1959; Kamp et al., 2012; Noterman, 2016; Sanchez & Burrige, 2007).

Dans son traité des plaies de la tête, Hippocrate (460 - 370 avant J. C.) a distingué le TC en plusieurs catégories : fissure osseuse avec contusion, contusion seule, fracture crâniale avec enfouissement, empreintes avec ou sans fracture (marque de l'objet contondant), les fractures à distance en introduisant le concept du contrecoup, et les blessures sur les sutures crânielles. Pour lui, il est fondamental de connaître les circonstances et l'objet contondant utilisé pour convenir de la gravité de la blessure post-traumatique. Il décrit en détail la procédure de sondage de la blessure avec des recommandations. La trépanation, une procédure neurochirurgicale encore pratiquée de nos jours, est décrite en détail et son but, écrit par Hippocrate, est de drainer le pus ou l'hémorragie et doit être réalisée le plus tôt possible. Hippocrate indique également qu'une atteinte de la dure-mère provoque des complications de la blessure (Bertullo, 2015; Ganz, 2015; Noterman, 2016; Panourias et al., 2005).

Aulus Aurelius Cornelius Celsus (25 avant J. C. - 50 après J. C.) était un encyclopédiste relatant dans ses écrits la connaissance médicale depuis Hippocrate jusqu'à l'école de médecine d'Alexandrie. Une description approfondie des symptômes survenant après le TC y est relatée telle que les vomissements, le saignement du nez et/ou des oreilles, une incapacité dans la communication verbale, la condition motrice altérée et une perte de conscience. Ces trois derniers paramètres sont les prémisses de l'échelle de Glasgow utilisée pour définir la gravité du TC (Kshetry et al., 2007). Celsus suggère qu'une perte de conscience indiquerait une atteinte cérébrale diffuse et que des lésions focales induisent des troubles moteurs ou d'aphasie. Pour lui, l'examen de ces indicateurs permet d'établir une suspicion de fracture à la base du crâne et que de graves lésions cérébrales sont souvent associées à des lésions du tronc cérébral. Il mentionne également qu'un TC grave provoque une hypertension intracrânienne. La survenue de ces symptômes souligne un état d'urgence et le besoin d'une intervention médicale. Il écrit également les signes classiques de l'inflammation et d'une rupture de l'artère méningée moyenne provoquant un hématome extradural accompagné d'une douleur et de troubles de la conscience (Bertullo, 2015; Ganz, 2015; Noterman, 2016; Talamonti et al., 2020).

Les écrits sur le TC au cours des âges et sur les différents continents, nous informent sur les débuts de la médecine, de la chirurgie, et sur les premiers efforts de compréhension des séquelles post-traumatiques qui ont évolués jusqu'à nos jours. Les descriptions des complications et des soins prodigués à l'époque anticipent les recommandations actuelles.

I.3. Epidémiologie et étiologie du traumatisme crânien

L'épidémiologie du TC est largement documentée, mais son véritable impact sur la société est difficile à déterminer en raison de la variabilité sur la définition du TC et sur la classification des différents types de TC. Le TC est souvent identifié par la Classification Internationale des Maladies (CIM). L'inclusion de blessures superficielles à la tête donne de faux-positifs, conduisant à amplifier le nombre de TC ou à l'inverse, à sous-estimer ce nombre si le choix d'exclure les blessures à la tête (*head injury*) a été fait (Chen & Colantonio, 2011). L'OMS et l'ACRM n'intègrent pas similairement les patients atteints d'un TC léger, pouvant également induire un biais. En second lieu, les recueils sont basés sur le taux d'hospitalisation et de consultation des patients dépendant de la sévérité du TC et sur celui des individus recherchant le soin, ou se trouvant à proximité d'un centre médical (ex. individus vivant dans un pays en développement ou en guerre dont l'accès aux hôpitaux est difficile). Dans ce cadre-là, les TC légers sont probablement sous-estimés. Les patients atteints d'un TC sévère et décédant à leur arrivée à l'hôpital ne sont souvent pas comptabilisés (Mollayeva et al., 2018; Roozenbeek et al., 2013). De plus, les critères d'inclusion des patients varient pour différents facteurs comme l'âge, le sexe, la gravité, l'ethnie, la période d'étude, etc. Enfin, la surveillance épidémiologique pour le TC présente des lacunes contrairement à d'autres pathologies.

I.3.1. Incidence et prévalence

L'incidence représente le nombre de nouveau cas d'une pathologie donnée sur une période temporelle de référence. Toutes sévérités confondues, l'incidence du TC dans la population mondiale est de 200 à 400 pour 100 000 personnes par an (James et al., 2019; Mollayeva et al., 2018; Peeters et al., 2015; Roozenbeek, Bob et al., 2013). Plus récemment, Dewan *et al.* (2018) estimaient que 69 millions de personnes souffrent de TC par an dans le monde, ce qui représenterait 939 cas pour 100 000 habitants par an. Cette étude dénonçait une incidence globale variable de 1 299 cas pour 100 000 par an en Amérique du Nord et de 1 012 cas pour 100 000 par an en Europe. Aux Etats-Unis, l'incidence globale sur la période 2000 - 2006 était de 579 cas pour 100 000 personnes avec un taux d'hospitalisation de 93,8 cas pour 100 000 personnes et en 2016 de 329 cas pour 100 000 par an (Faul & Coronado, 2015; James et al., 2019). La répartition de l'incidence est inégale dans le monde (**Figure 2**). En Europe, elle varie entre 200 à 300 cas pour 100 000 par an (James et al., 2019; Maas et al., 2017; Majdan et al., 2016; Roozenbeek et al., 2013). La grande majorité des TC sont légers avec 224 - 740 cas pour 100 000/an, contrairement aux TC modérés et sévères avec 23 et 13 - 73 cas pour 100 000 habitants par an, soit 10 et 17 fois plus bas (Maegele et al., 2019; Nguyen et al., 2016; Peeters et al., 2015). La proportion des TC suivant leur gravité est donc estimée de 81 % de TC légers, 11 % modérés et 8 % sévères (Dewan et al., 2018; Maegele et al., 2019).

En 2016, 55,5 millions de personnes vivaient avec un handicap lié à un TC (prévalence globale standardisée selon l'âge de 759 pour 100 000 habitants par an). Les auteurs ont également observé une augmentation de 8,4 % de la prévalence du TC entre 1990 et 2016 (James et al., 2019). La prise en charge du TC est onéreuse et le coût annuel représente 400 milliards de dollars par an au niveau mondial (environ 0,5 % de la production totale annuelle) (Maas et al., 2017). En 2010, cette charge a été estimée à 10 milliards de dollars aux Etats-Unis et de 33 milliards de dollars en Europe (Corrigan et al., 2010; Olesen et al., 2012).

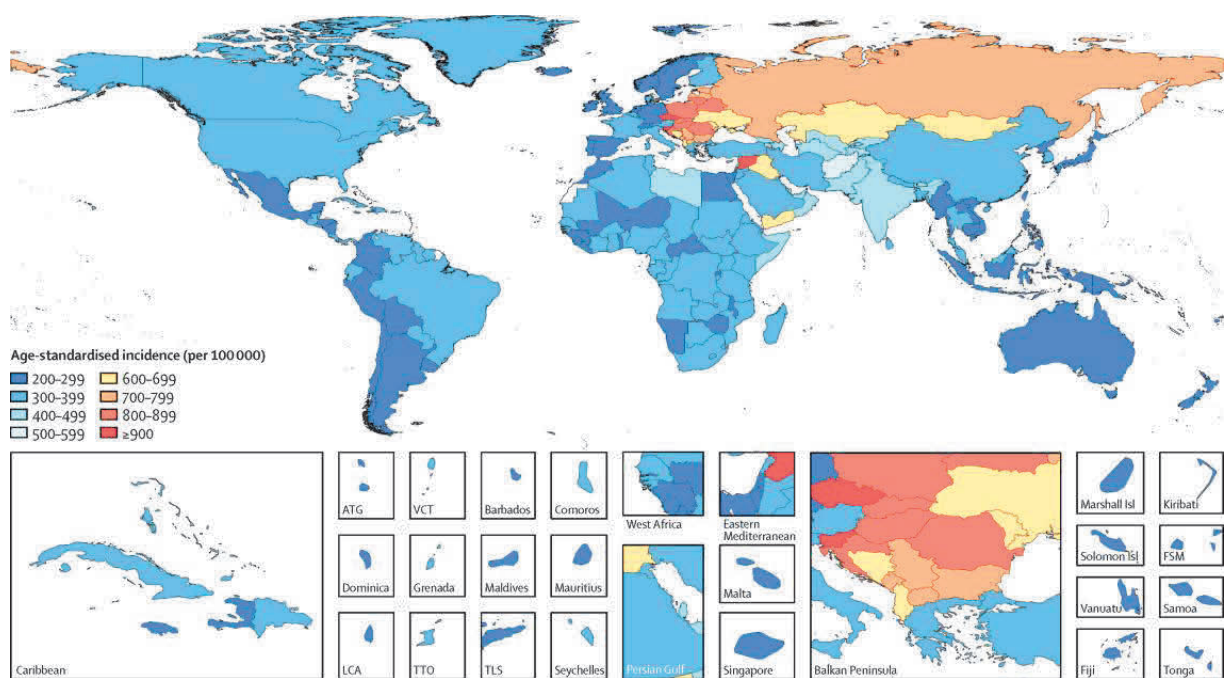


Figure 2. Carte d'incidence du traumatisme crânien dans le monde en 2016. Incidence standardisée selon l'âge suivant les régions. Exprimée en nombre de cas pour 100 000 personnes par localisation. ATG = Antigua et Barbuda, FSM = les États fédérés de Micronésie, Isl = Islande, LCA = Sainte-Lucie, TLS = Timor oriental, TTO = Trinité-et-Tobago, VCT = Saint-Vincent et les Grenadines. D'après (James et al., 2019).

I.3.2. Mortalité et handicap

Aux Etats-Unis et en Europe, l'incidence de la mortalité par TC est comprise entre 10 et 20 cas pour 100 000 habitants par an (Maas et al., 2017) et représenterait 82 000 cas de décès en 2012 en Europe (Majdan et al., 2016). Néanmoins, une étude de 2018 réalisée en Europe par le biais du CENTER-TBI montre une hétérogénéité nationale allant de 9 à 28,1 pour 100 000 habitants par an, et

régionale de 3,3 à 24,4 pour 100 000 habitants par an (Brazinova et al., 2018). Les TC modérés-sévères induisent 20 à 40 % de décès (Maas et al., 2017; Maegele et al., 2019).

Le taux d'hospitalisation en Europe pour cause de TC est de 287 pour 100 000 habitants par an (Majdan et al., 2016; Peeters et al., 2015). Les patients atteints d'un TC, en particulier ceux avec une gravité modérée à sévère, montrent des évolutions de leur état de santé dans le temps. En effet, ces hautes sévérités ont un fort taux de mortalité précoce, pendant les premiers jours post-TC, mais aussi tardive dans une moindre mesure, et l'état de santé des patients peut évoluer pendant plusieurs années. Jochens *et al.* (2018) indique un taux de mortalité de 33 % des patients traumatisés lors de leur arrivée aux urgences, dont 82 % après une décision de limitation ou d'arrêt de traitement. Dans les trois mois après le TC, 71 % des patients survivants montraient de bons résultats de récupération. Néanmoins, le TC peut entraîner une invalidité et/ou un décès après l'hospitalisation. Au cours des 6 à 12 mois après un TC modéré-sévère, 38 à 52,8 % des patients montraient de bons résultats de récupération sur la base des grilles de score neurologique (Andriessen et al., 2011; Gritti et al., 2019). L'étude menée par Maegele *et al.* (2019) montre chez les patients traumatisés sévères survivants un taux de 14,9 % d'handicap grave ou d'état végétatif et que 61,1 % se rétablissent avec un léger handicap ou sans séquelles. Dans une cohorte de 846 patients ayant subi un TC sévère, Jiang *et al.* (2002) ont évalué les patients un an après : 32 % présentaient un bon rétablissement, 14 % une invalidité modérée, 24 % une invalidité grave, 1 % était dans un état végétatif et 29 % étaient décédés à l'hôpital. Une étude longitudinale sur 5 à 10 ans chez des patients traumatisés modérés-sévères a montré qu'une détérioration des résultats est observée dans 37 % des cas, que 7 % se sont améliorés et que 56 % n'ont pas changé au cours de cette phase de long terme (Forslund et al., 2019).

Malgré un rétablissement et une sortie de l'hôpital, les patients atteints de TC sévères peuvent présenter des séquelles, une invalidité et/ou un handicap se développant au cours du temps. Cette pathologie doit donc être considérée comme une pathologie chronique et évolutive (Forslund et al., 2019).

I.3.3. Étiologie et facteurs de risque

Les causes du TC sont variables en fonction de la population étudiée. Dans le monde, toutes sévérités confondues, les causes prédominantes sont les accidents de la voie publique et les chutes (Jochems et al., 2018; Maas et al., 2017), suivi par le sport et les violences inter-individuelles (maltraitance, violence domestique, etc). En outre, le TC est l'une des blessures résultant de la maltraitance des jeunes enfants. Actuellement, la tendance générale des TC en Europe Centrale est la prédominance des chutes avec près de 50 % d'incidence standardisée selon l'âge (James et al., 2019). L'étude Paris-TBI révèle que 53 % des TC sévères étaient secondaires à des accidents de la voie

publique et 35 % à des chutes (Jourdan et al., 2013). Les TC découlant d'un accident de la route sont plus fréquents dans les pays à faibles revenus (Dewan et al., 2018). Cela peut s'expliquer par un accroissement démographique, une grande proportion de jeunes adultes et aussi par l'absence de politique de prévention routière et de l'entretien des routes. Concernant l'âge, trois catégories se distinguent avec une forte incidence du TC. En effet, les moins de 5 ans et les plus de 60 ans sans différence entre les hommes et les femmes sont d'abord concernés par les chutes, tandis que les jeunes adultes le sont plutôt par les accidents de la voie publique (Figure 3.A) (Faul & Coronado, 2015; Tagliaferri et al., 2006). Avec l'âge, le pronostic du TC se détériore. Les adultes de plus de 65 ans présentent un taux élevé de mortalité et d'hospitalisation avec un haut risque de morbidité et de décès (Masson et al., 2001). Une divergence entre les hommes et les femmes suivant l'âge existe lors de ces trois pics. La disparité entre les sexes est marquée à partir de 10 ans jusqu'à 60 ans pour toutes gravités de TC avec une prévalence plus élevée chez les hommes (Figure 3.B-C). L'incidence maximale est plus marquée pour les TC sévères chez l'homme vers 25 - 33 ans correspond aux accidents de la route (James et al., 2019; Maegele et al., 2019). Le ratio hommes-femmes des TC en Europe et en moyenne de 2,2 et variant de 1,6 à 4,7 suivant le pays (Majdan et al., 2016). L'abus d'alcool, la consommation de drogue, les troubles d'équilibres et de mobilités constituent également des facteurs de risque.

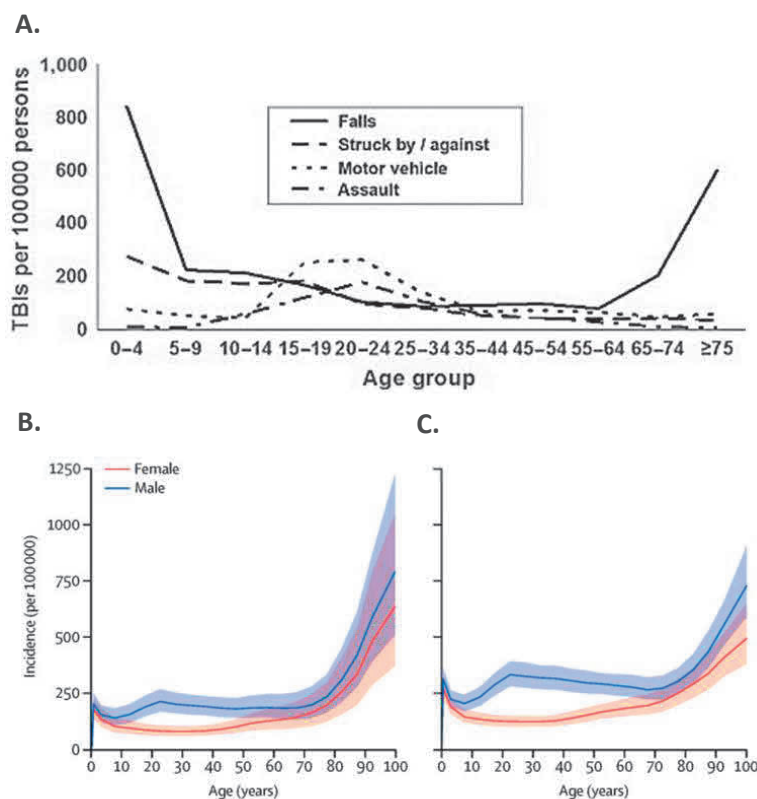


Figure 3. Incidences du traumatisme crânien global. A. Principales causes du TC en fonction de l'âge (Faul & Coronado, 2015). Incidence globale pour les traumatismes crâniens légers (B) et modérés à sévères (C) en fonction de l'âge et par sexe (James et al., 2019). Exprimés en nombre de cas pour 100 000 personnes.

I.4. Classification du traumatisme crânien

Deux principales questions se posent devant un patient traumatisé : le risque vital à court terme et le risque fonctionnel sur le long terme. La classification d'une pathologie est intimement liée au diagnostic initial, au pronostic et au traitement adéquat pour l'intervention thérapeutique. L'hétérogénéité des TC rencontrés en pratique clinique demande de prendre en compte : la nature et les mécanismes physiques et physiopathologiques mis en jeu par le TC, les aires cérébrales impactées, les lésions sous-jacentes et leurs évolutions, l'état de santé global du patient, ainsi que la gravité du TC. Saatman *et al.* (2008) ont défini quatre catégories de classifications : étiologique, symptomatique, anatomopathologique et pronostic (liée à l'évolution de l'état de santé du patient). De multiples instruments d'évaluation ont été développés au cours du temps, ce qui représente un atout pour la compréhension de la pathologie, mais questionne sur leur harmonisation à l'échelle internationale. Dans cette partie, les principales méthodes ont été exposées.

I.4.1. Classification étiologique

Ce mode de classification est utilisé pour caractériser les causes de la pathologie et donc ici, le mécanisme physique responsable de l'induction du traumatisme et des blessures qui en découlent. Deux principaux phénomènes sont décrits.

Le premier est l'**impact direct** sur la boîte crânienne, c'est-à-dire par contact, comme lors d'une frappe, d'un coup et/ou contrecoup, ou d'un objet heurtant la tête (**Figure 4.A**). Les chutes induisent ce type de TC, mais aussi les impacts reçus dans le cadre de la pratique des sports de contact. Cette catégorie de TC peut également être responsable d'une ouverture de la boîte crânienne (TC pénétrant) par le biais d'un impact avec un objet contendant, et dans ce cas, l'enveloppe cutanée, les os crâniens et/ou les méninges ne sont plus intacts. Ce sont des TC dits ouverts. À l'inverse, un TC fermé signifiera qu'aucune lésion n'est présente à l'extérieur de la boîte crânienne et que seul le cerveau sera atteint. Le deuxième mécanisme physique est sans contact par l'effet de l'**inertie**, le cerveau se déplace à l'intérieur de la boîte crânienne, par exemple lors d'une rotation, sous l'effet d'un mouvement soudain (accélération) ou d'un arrêt brusque (décélération). Généralement, l'accélération et la décélération sont conjuguées (**Figure 4.B**). La majorité des TC induits lors des accidents de la route provient de ce phénomène.

Il existe une certaine corrélation entre le type de blessure induite et le mécanisme physique de l'accident. Ainsi, les lésions focales proviennent principalement d'un contact direct entre le cerveau et l'os crânien lors d'une fracture osseuse, d'un hématome et/ou de lésions pénétrantes. Au contraire, les lésions diffuses sont généralement induites par l'effet de l'inertie, ou lors du contrecoup retrouvé

dans le cadre, par exemple, des accidents sportifs, et induisent des œdèmes homogènes ainsi que des lésions axonales diffuses (Saatman et al., 2008). Un troisième mécanisme est le **souffle d'une explosion** et concerne en particulier les militaires et les civils en zones de guerre (**Figure 4.C**). Il est caractérisé par des ondes de chocs transitoires de pression qui se déplacent rapidement (Bryden et al., 2019). L'énergie cinétique générée provoque une déformation du cerveau, créant ainsi des lésions multifocales et diffuses.

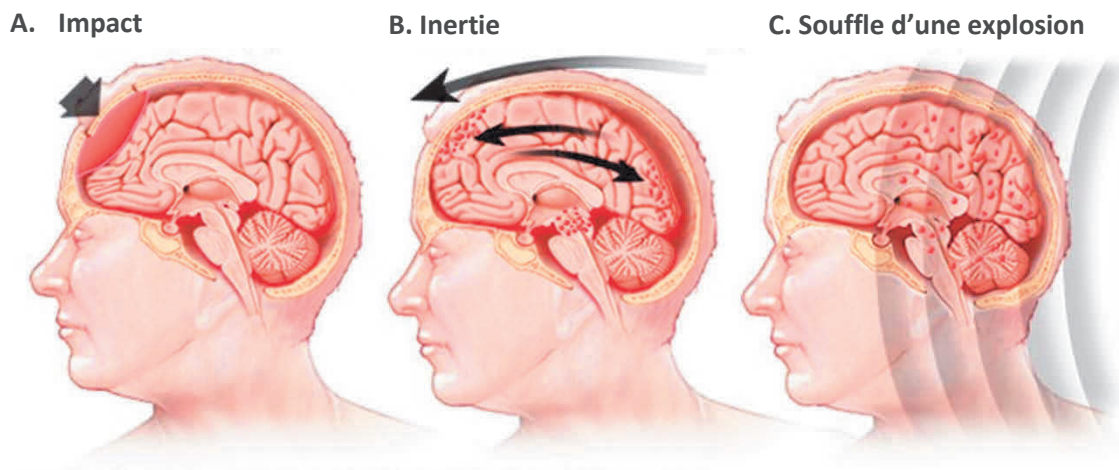


Figure 4. Illustration des mécanismes physiques provoquant un traumatisme crânien. Trois phénomènes induisent un traumatisme crânien : l'impact direct (A), l'inertie (B) et l'onde d'une explosion (C). D'après <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/concussion/multimedia/img-20456526>.

I.4.2. Classifications de la gravité

Ce classement repose sur la manifestation clinique de symptômes post-traumatiques immédiats. Différentes échelles ont été réalisées pour stratifier la gravité du TC. Ces méthodes ont été développées dans le but d'améliorer la classification, d'aider au triage des patients et également, de guider l'interprétation pour le pronostic des patients.

I.4.2.a. Gravité lésionnelle globale

Les échelles de gravité lésionnelle globale ne se centrent pas seulement sur la tête mais sur les blessures de l'ensemble du corps.

L'*Association for the advancement of automotive medicine* a développé en 1969 un système de codage basé sur une échelle anatomique pour hiérarchiser et comparer les blessures suivant leur type, leur localisation et de leur sévérité : **Abbreviated Injury Scale** (AIS). Ce score de gravité répartit

les lésions mineures (score de 1), modérées (2), sérieuses (3), sévères (4), critiques (5) et enfin possiblement fatales (6). Cependant, le pronostic n'est pas toujours corrélé à ce score et les paramètres physiologiques ne sont pas notés. L'**Injury Severity Score** est un dérivé de l'AIS basé sur la localisation des blessures : la tête, le visage, le cou, le thorax, l'abdomen/le bassin, la colonne vertébrale, les membres supérieurs, les membres inférieurs et autres. Le score final est la somme au carré des trois valeurs les plus sévères des trois blessures les plus importantes. Le taux de mortalité est corrélé à l'**Injury Severity Score**. Il est principalement utilisé chez les patients polytraumatisés. Un score supérieur à 15 détermine un traumatisme sévère. Ce système est souvent exploité pour la comparaison et les études sur les patients. Cependant, les blessures localisées dans une même zone anatomique ne seront pas considérées. De plus, ces échelles ne permettent pas de recommander une stratégie thérapeutique (Restrepo-Álvarez et al., 2016; Saatman et al., 2008).

I.4.2.b. Gravité neurologique

L'**échelle de Glasgow** (*Glasgow Coma Scale*, GCS) est majoritairement utilisée en clinique pour identifier la gravité du TC à partir de l'état de conscience du patient. Cette grille a été développée par Teasdale et Jennett (1974). Elle est simple d'utilisation et permet d'évaluer quotidiennement l'état de conscience des patients comateux après un TC et sa gravité. Le GCS donne un score total basé sur trois critères comportementaux : oculaire, verbal et moteur (**Tableau I**).

Tableau I. L'échelle de Glasgow. Elle indique l'état de conscience du patient par l'intermédiaire d'un score global sur 15 représentant la somme des scores sur trois critères : les réponses oculaires, verbales et motrices.

Score	Réponse oculaire (4)	Réponse verbale (5)	Réponse motrice (6)
1	Absence	Absence	Absence
2	A la douleur	Sons incompréhensibles	Extension anormale (décérébration)
3	A la demande	Paroles inappropriées	Flexion anormale (décortication)
4	Spontanée	Confuse	Retrait à la douleur
5		Orientée	Localise la douleur
6			Obéit aux ordres

Ainsi, un sujet sain et conscient obtiendra un score de 15 tandis qu'un patient sans réponse ou dans un coma profond aura un score inférieur à 6 (Teasdale & Jennett, 1976) :

- TC léger : ≥ 13
- TC modéré : 9 - 12
- TC sévère : ≤ 8

Un patient ayant un TC sévère a un haut risque de développer des lésions secondaires. L'avantage de la grille vient de sa rapidité de mise en œuvre et de sa simplicité d'interprétation. Néanmoins dans certaines situations, l'évaluation de la gravité des lésions manque de précision. En effet, différents paramètres comme l'administration de médicaments (sédatif et/ou paralysant), la ventilation artificielle, la présence de lésions neurologiques préexistantes, l'intoxication ou toutes autres plaies peuvent directement impacter le score de GCS. Par exemple, un patient intubé sera dans l'incapacité de réaliser la demande verbale (Saatman et al., 2008). Une autre difficulté de son utilisation réside de son application en pédiatrie, qui a motivé son adaptation aux jeunes enfants de moins de 5 ans, ainsi qu'aux nourrissons (Holmes et al., 2005).

D'autres systèmes et échelles de classification de la gravité existent. **La perte de conscience** (*loss of consciousness, LOC*) est une échelle divisée en trois catégories suivant la durée du changement de l'état mental ou de la perte de conscience. Ainsi, le TC d'un patient présentant un temps de perte de conscience supérieur à 24 h sera classé sévère. La classification VA/DOD intègre le critère temporel de l'**altération de la conscience/de l'état mental** (*alteration of consciousness, AOC*). Suite à un TC, les symptômes d'un patient sont l'impression d'être hébété et incertain à ce qui l'entoure, la confusion, la difficulté à penser clairement ou à répondre et l'incapacité à décrire les événements immédiats avant ou après le traumatisme. Les patients ayant un TC sévère auront une AOC supérieure à 24 h et qui devra être spécifié par d'autres critères (Healy et al., 2014). L'**amnésie post-traumatique** (*posttraumatic amnesia, PTA*) quant à elle décrit le temps entre la blessure et le moment où le patient retrouve une mémoire continue. Le patient doit retrouver un état de conscience afin d'être à nouveau capable de communiquer par la parole, l'écriture ou la gestuelle. Le TC sévère sera décelé chez un patient avec un temps d'amnésie post-traumatique supérieur à 7 jours (Andriessen et al., 2010; O'Neil et al., 2014).

Cependant, les patients ayant un TC sévère ont un profil différent suivant les séquelles sous-jacentes, de par l'existence de lésions anatomopathologique et physiopathologique. Pour cela, la prise en charge des patients sera différente (**Figure 5**). Par exemple, un patient ayant un hématome épidural aura une craniotomie décompressive pour évacuer le sang et ainsi diminuer la pression intracrânienne. C'est pourquoi les patients traumatisés modérés-sévères passent un examen d'imagerie médicale, la tomographie axiale cérébrale (TDM) pour évaluer les séquelles anatomopathologiques, en plus de l'examen GCS.

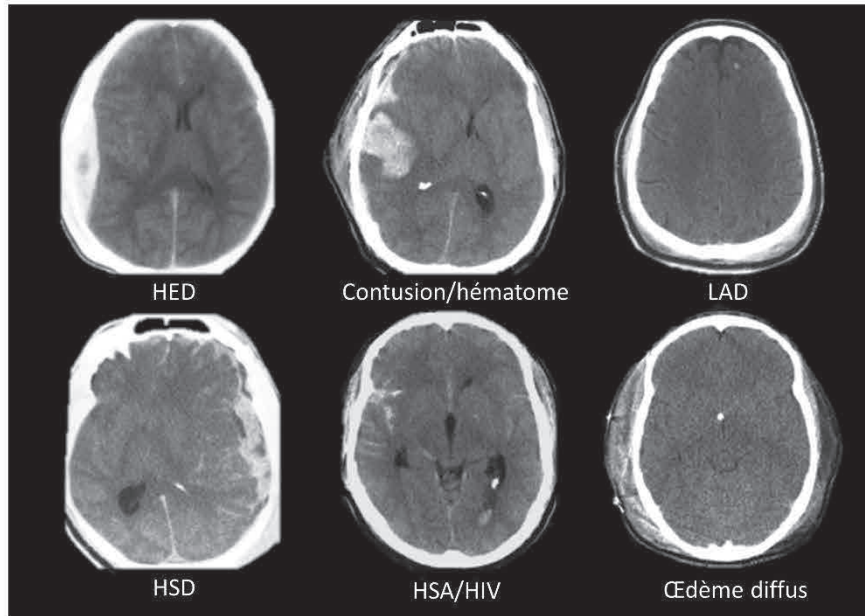


Figure 5. Hétérogénéités des séquelles pathologiques des traumatismes crâniens sévères. Tomodensitométrie de six patients différents ayant un score de l'échelle de Glasgow inférieur à 8 et présentant différentes formes de séquelles anatomopathologiques : hématome épidural (HED), contusion et hématome parenchymateux (contusion/hématome), lésions axonales diffuses (LAD), hématome sous-dural (HSD), hémorragie sous-arachnoïdienne avec une hémorragie intraventriculaire (HSA/HIV) et un œdème cérébral diffus (œdème diffus). D'après (Saatman et al., 2008).

I.4.3. Classifications pathologiques

L'**anatomopathologie** est utilisée pour décrire la localisation cérébrale et le caractère lésionnel du TC. Le processus **physiopathologique** mis en route par un TC détermine l'évolution spatio-temporelle de la lésion avec son aggravation potentielle. Lors d'un TC grave, les lésions sont souvent multiples, de types variés et touchant des structures différentes.

I.4.3.a. Selon l'anatomopathologie

Les lésions sont réparties suivant le plan **axial extra- à intra-crânial**. Les blessures peuvent se former à chaque niveau anatomique de la tête en commençant par le cuir chevelu puis les os, les méninges, le parenchyme cérébral, les ventricules jusqu'aux lésions axonales, et ceci par des manifestations lésionnelles de contusion, de lacération ou d'hémorragies (**Figure 6**) (Saatman et al., 2008).

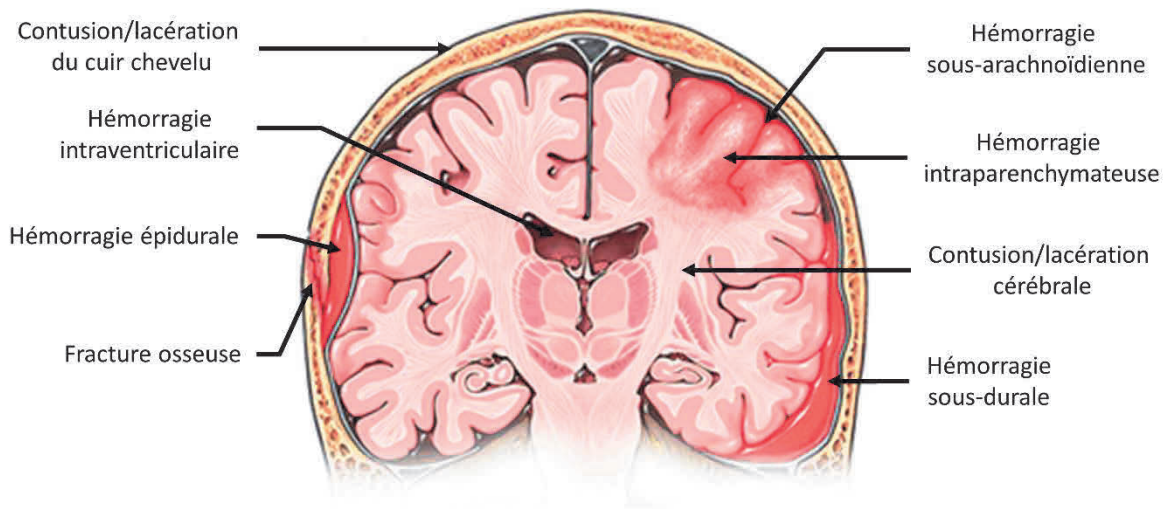


Figure 6. Représentation des blessures anatomopathologiques. Lésions produites par un traumatisme crânien qui sont utilisés pour classer les patients à l'aide d'un examen d'imagerie (scanner). Illustration modifiée d'après <https://www.eastcoasttriallawyers.com/2015/10/traumatic-brain-injury-causes-vary>.

Comme mentionné précédemment, des lésions focales et/ou diffuses surviennent immédiatement lors du TC. Les **lésions focales** englobent les contusions et les hématomes aux différents niveaux épidural, sous-dural, intra-parenchymateux, intraventriculaire, tandis que les **lésions diffuses** concernent principalement les lésions axonales, l'œdème cérébral, mais aussi les troubles métaboliques, hypoxiques, ischémiques et microvasculaires (McKee & Daneshvar, 2015). Maschall *et al.* (1991) ont développé une échelle se basant sur les diagnostics lésionnels observables à partir des données de TDM. Ce **score de Marshall** est une échelle ordinale composée de six catégories classées suivant l'observation des lésions diffuses et/ou focales (**Tableau II**). Le score de Rotterdam a été plus récemment développé sur la classification à l'aide de l'imagerie TDM, et semble être un meilleur moyen de pronostic (Maas *et al.*, 2005; Munakomi, 2016). L'examen TDM est réalisé précocement en routine et joue un rôle important pour cartographier les blessures sous-jacentes du TC en particulier sévère, lorsque les patients ont une perte de conscience. Cette classification permet une prise en charge rapide des individus mais n'est pas fiable pour le pronostic à long terme.

Tableau II. Le score de Marshall.

Catégories	Définition
Lésion diffuse	
Grade I	Pas de lésions visibles au CT-scan cérébral
Grade II	Citernes de la bases présentes avec déplacement de la ligne médiane 0-5 mm et lésions et/ou densités visibles < 25 cm ³ incluant les fragments osseux et les corps étrangers
Grade III (gonflement)	Citernes comprimées ou absentes avec déplacement de la ligne médiane 0-5 mm et lésions et/ou densités lésionnelles visibles ≥ 25 cm ³
Grade IV (engagement)	Déplacement de la ligne médiane > 5 mm et lésions et/ou densités visibles > 25 cm ³
Lésion focale (hématome/contusion)	
Grade V (évacuée)	Lésions évacuées chirurgicalement
Grade VI (non évacuée)	Présence de toutes lésions et/ou densités > 25 cm ³ non évacuées chirurgicalement

I.4.3.b. Selon la physiopathologie

Les lésions focales et diffuses font partie des lésions dites **primaires** qui sont inévitables et apparaissent lors du choc traumatique, ainsi que des **lésions secondaires** qui se développent au cours des minutes, des jours voire des mois après le TC. L'enjeu majeur de la thérapeutique actuelle concerne le développement de ces lésions afin de les limiter, voire de les éviter. Ces lésions seront décrites dans la partie II de l'introduction.

L'évolution spatio-temporelle de ces blessures est observée par le biais de différents outils comme la TDM ou encore l'imagerie par résonance magnétique (IRM), également par des biomarqueurs comme la pression artérielle ou intracrânienne, l'hypoxémie ou par les concentrations de neurotransmetteurs présents dans les fluides corporels (sang, fluide interstitiel).

Ces modes de classification sont notamment utilisés pour prédire le devenir des patients, notamment des traumatisés les plus sévères.

I.4.4. Diagnostic, pronostic et évaluation

Il est de plus en plus reconnu que la gravité et le type de TC ne doit pas se limiter à un classement unidimensionnel reposant uniquement sur le GCS, mais doit intégrer les différentes

caractéristiques physiques, physiopathologiques, cliniques, les examens en imagerie et les biomarqueurs pronostiques. L'intérêt de ces méthodes est de guider l'évaluation, la prise en charge et l'établissement d'un pronostic.

I.4.4.a. Les échelles et questionnaires

Le **Glasgow Outcome Scale** (GOS) est couramment utilisé en clinique. Il est divisé en cinq catégories afin de prédire l'évolution sur le long terme de la réadaptation et du rétablissement des patients. Cependant, ces résultats ne tiennent pas compte de la nature multidimensionnelle des lésions (physique, cognitive, sociale). Le GOS étendu (GOSE) a été proposé pour améliorer la caractérisation de la situation des patients avec la subdivision des trois derniers niveaux du GOS (handicap sévère, moyen et bonne récupération) en niveau inférieur et supérieur (**Tableau III**). Néanmoins, cette grille d'évaluation souffre d'un manque de données relevant de la cognition, du bien-être dans la vie quotidienne, et d'autres facteurs plus généraux. Cette problématique est d'autant plus vraie pour les TC légers pour lesquels les patients montrent une bonne récupération avec le score de GOSE mais souffrent par exemple d'anxiété ou de dépression (Maas et al., 2017).

Tableau III. Glasgow Outcome Scale (GOS) et son étendu (GOSE) avec les niveaux inférieurs (Inf.) et supérieurs (Sup.).

GOS	GOSE	Interprétation
1 – Mort ou inconscient		Mort
2 – Etat végétatif		Absence de fonctions mentales supérieures et dommages sévères
3 – Handicap sévère	3 – Inf.	Lésions graves avec une aide partielle pour la vie quotidienne
	4 – Sup.	Lésions graves avec une aide permanente pour la vie quotidienne
4 – Handicap modéré	5 – Inf.	Indépendant mais sans retour à une activité sociale
	6 – Sup.	Quelques handicaps existants mais retour à une activité
5 – Handicap léger	7 – Inf.	Déficit mental ou physique mineur affectant la vie quotidienne
	8 – Sup.	Récupération entière ou symptômes mineurs sans affecter la vie quotidienne

L'échelle de *Coma Recovery Scale Revised* intègre des notions fonctionnelles neurologiques plus complètes avec les fonctions auditive, visuelle, motrice, verbale/oromotrice, de la communication et de l'éveil. Elle peut aussi estimer l'évolution des soins en post-aiguë et lors de la réadaptation. D'autres grilles de score se tournent vers l'évaluation du retour à une vie quotidienne normale et de

l'autonomie du patient comme le *Functional Independence Measure* pour diagnostiquer la réadaptation et du progrès réalisé. Des questionnaires tels que le QOLIBRI s'orientent plutôt sur la qualité de vie après une lésion cérébrale.

I.4.4.b. La neuroimagerie

La neuroimagerie permet de poser un diagnostic (précoce avec la TDM) et un avis décisionnel pour le traitement adéquat. L'IRM comparée au TDM, donne plus d'informations de par sa haute résolution et des séquences variées pour évaluer la morphologie anatomique après le TC. L'IRM conventionnelle morphologique comprend les séquences T1, T2 (anatomique), T2*, le FLAIR (*Fluid Attenuated Inversion Recover*) et l'IRM multimodale de diffusion (DTI, tenseur de diffusion). Les séquences T2 et FLAIR sont idéales pour visualiser les œdèmes, les contusions, les hématomes, les hémorragies sous-arachnoïdiennes. Tandis que le T2* met en avant les lésions axonales diffuses comme les micro-hémorragies de la substance blanche. Enfin, le DTI mesure plus précisément ces lésions notamment les cisaillements axonaux (Galanaud et al., 2012; Kinnunen et al., 2011). Il a été montré que les modifications DTI sont associées à un dysfonctionnement cognitif comme la mémoire et l'apprentissage (Salmond et al., 2006). Cependant, le temps de réalisation de cette séquence est long donc l'état des patients traumatisés sévères ne permet pas toujours de la réaliser en phase aigüe mais plus tardivement (≥ 10 jours). Le DTI semble également être un biomarqueur adéquat et fiable pour prédire l'évolution du patient.

I.4.4.c. De la modélisation au pronostic

Il existe différentes modélisations pour estimer le pronostic des patients.

L'étude **IMPACT** (*International Mission on Prognosis and Analysis of Clinical Trials*) a mis en place une banque de données constituée d'analyses individuelles de nombreux patients traumatisés modérés à sévères. Les chercheurs ont ainsi développé trois modèles basés sur les variables (âge, sexe, etc.) décrites dans les cohortes étudiées. Les formules établies de ces modèles aboutissent à une probabilité de mortalité à six mois ou d'une évolution défavorable (état végétatif persistant ou invalidité grave) et aident à prédire l'évolution du patient hospitalisé. Le premier modèle intègre des variables indépendantes : l'âge, le score moteur du GCS et la dilatation des pupilles. Puis, d'autres facteurs de pronostics ont été ajoutés pour les deux autres méthodes, comme l'échelle de Marshall et les caractérisations supplémentaires de la TDM, l'hypotension, l'hypoxie, les autres composantes du GCS ainsi que les données biologiques (glucose, hémoglobine, etc.) (Maas et al., 2008; Steyerberg et al., 2008).

CRASH (*Corticoid Randomisation After Significant Head injury*) est également un système de pronostics pour estimer la mortalité à 14 jours et l'invalidité grave à 6 mois chez les patients

traumatisés. Les variables utilisées sont les mêmes que pour l'IMPACT avec en plus le sexe, la cause de la lésion, le temps écoulé avant la prise en charge, le GCS initial, l'existence de lésions extra-crâniennes et le niveau de revenu du pays (Perel et al., 2008).

Ces deux méthodes peuvent modéliser l'évolution de certains patients traumatisés modérés à sévères (Roosenbeek et al., 2012; Wongchareon et al., 2020).

I.5. Résumé

Le traumatisme crânien est une pathologie hétérogène et multifactorielle touchant l'ensemble de la population mondiale. Ce phénomène est induit par une force mécanique externe véhiculant une énergie supérieure à ce que l'ensemble de la tête peut supporter, provoquant une altération des fonctions physiologiques. De multiples méthodes sont utilisées pour classer les TC dont celle du score de Glasgow catégorisant les blessures traumatiques légères, modérées et sévères. Huit pourcents des patients traumatisés sont classés sévères et présentent un fort taux de mortalité, ainsi qu'un nombre élevé d'invalidité et d'handicap. La gravité du TC est traduite par un GCS bas avec une perte de conscience supérieure à 24 h et une amnésie post-traumatique supérieure à 7 jours (**Tableau IV**). Les patients atteints d'un TC sévère ont des séquelles variables visibles par la neuroimagerie. L'évolution de l'état de santé des patients avec un TC sévère est souvent défavorable, avec de fréquentes séquelles de long terme. La prise en charge de ces patients est lourde.

Tableau IV. Description et sévérité du traumatisme crânien. GCS : score de Glasgow, LOC : perte de la conscience, PTA : amnésie post-traumatique. D'après (Andriessen et al., 2010; Cristofori & Levin, 2015).

Sévérité	GCS	LOC	PTA	Imagerie structurelle (% anomalie possible)
Légère	13 - 15	0 - 30 min	< 24 h	Normale (0 - 10)
Modérée	9 - 12	30 min - 24 h	1 - 7 jours	Normale - anormale (10 - 90)
Sévère	≤ 8	> 24 h	> 7 jours	Normale - <u>anormale</u> (> 90)

II. Physiopathologie du traumatisme crânien

Le traumatisme crânien induit instantanément des dommages mécaniques au niveau cérébral aboutissant à la formation immédiate et directe de lésions dites primaires. Leur gravité dépend de la sévérité du traumatisme et des régions anatomiques impactées. Ces lésions sont peu réversibles et les possibilités de traitement sont réduites. Actuellement, les stratégies les plus efficaces consistent à prévenir les TC par des démarches de politiques publiques (ex. limitation de vitesse, normes de sécurité) et des changements de la culture publique (ex. abus d'alcool, port du casque et prévention de la posture dans les sports de contact ou des chutes pour les personnes âgées) (Centers for Disease Control and Prevention, 2019; Flores et al., 2019). Les atteintes traumatiques entrent ensuite dans un processus dynamique évolutif. En effet, des mécanismes physiopathologiques secondaires vont se développer à partir de ces lésions primaires, en recrutant des cascades biochimiques, cellulaires et physiologiques dans les heures, les jours voire les années (lésions tertiaires) après le TC. Cela aboutit à des séquelles non réversibles si aucune prise en charge n'est réalisée (**Figure 7**). Les conséquences de ces lésions secondaires peuvent être aussi graves que celles engendrées initialement. Néanmoins, le caractère retardé de ces lésions secondaires fournit une fenêtre temporelle pour de possibles interventions thérapeutiques. Ces différentes complications peuvent engendrer l'altération des fonctions cognitives, sensorielles, motrices et neurologiques s'installant dans le temps et pouvant être permanente. C'est pourquoi les recherches actuelles sur le TC sont principalement axées sur ces événements secondaires.

Les parties de ce chapitre établissent une liste non exhaustive des lésions pouvant se développer après un TC sévère : les lésions primaires et secondaires.

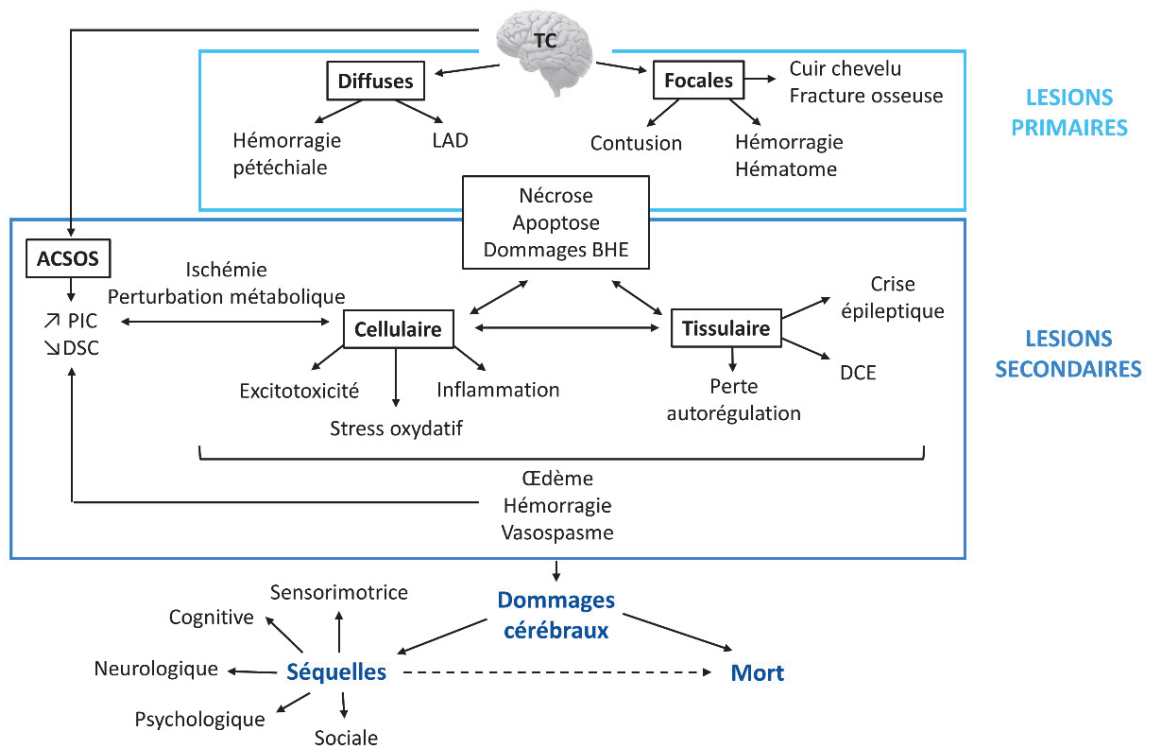


Figure 7. Mécanismes évolutifs impliqués dans les lésions cérébrales après un traumatisme crânien.

Représentation schématique de l'interdépendance entre les lésions primaires, systémiques et secondaires jusqu'à l'aboutissement de dommages cérébraux produisant des séquelles pouvant être irréversibles ou allant jusqu'à la mort de l'individu. BHE : barrière hémato-encéphalique, DCE : dépolarisation corticale envahissante, DSC : débit sanguin cérébral, LAD : lésion axonale diffuse, PIC : pression intracrânienne. D'après (Hill et al., 2016; Rovegno et al., 2012).

II.1. Lésions primaires

L'agression initiale physique du TC (choc direct, inertie ou souffle d'une explosion) provoque des **lésions biomécaniques** dans les quelques 50 à 200 millisecondes qui suivent l'accident. Ce sont les lésions primaires (Kaur & Sharma, 2018). Deux types de dommages primaires existent : les lésions cérébrales **focales** et **diffuses** (ou multifocales). Les lésions focales ont tendance à avoir des symptômes plus variés suivant l'anatomie pathologique (fracture osseuse, lacération, contusion, hémorragie, etc.). *A contrario*, les blessures diffuses produisent plutôt des effets homogènes (McKee & Daneshvar, 2015). Il est à noter que ces deux sortes de dommages peuvent coexister et interagir chez les patients souffrants de TC modérés-sévères. En effet, Skanden *et al.* (2010) ont observé par une étude IRM que près de 50 % des patients inclus dans leur protocole présentaient à la fois des lésions focales (ex. contusions ou hématomes) et diffuses (ex. lésion axonale diffuse ou œdème). Les dommages traumatiques primaires impactent *in fine* la vascularisation cérébrale et les différentes

populations cellulaires (neurones, astrocytes, oligodendrocytes, etc.) amenant à des lésions cérébrales physiologiques et structurelles. Des déficits cognitifs, sensoriels, moteurs (comme une hémiparésie), et des changements comportementaux peuvent être observés selon la gravité et la zone des lésions primaires (Ng & Lee, 2019). Nous excluons la commotion cérébrale qui est la forme la plus légère du TC touchant principalement les athlètes et les enfants (Choe, 2016; Hon et al., 2019; Mullally, 2017).

II.1.1. Lésions focales

II.1.1.a. Lacération du cuir chevelu

Un TC pénétrant peut engendrer une lacération du cuir chevelu. Cette lésion peut survenir dans toutes les sévérités traumatiques, mais surtout chez les patients polytraumatisés. Les couches cutanées cérébrales sont richement vascularisées ce qui cause un choc hypovolémique lors d'une lacération, c'est-à-dire d'un état de défaillance circulatoire aiguë caractérisé par une diminution sévère du volume sanguin circulant. Les patients traumatisés ayant une lacération du cuir chevelu avec une perturbation et/ou une fracture osseuse du crâne présentent un taux d'infection élevé et une issue neurologique défavorable pouvant aboutir au décès du patient (Almulhim & Madadin, 2021; Dhandapani et al., 2015).

II.1.1.b. Fractures et embarrures

Le crâne est constitué de 14 os du visage et de 8 os crâniens formant la boîte crânienne hermétique et non extensible, composée de la voûte et du plancher (Figure 8). Le rôle de la boîte crânienne est de soutenir et de protéger le cerveau, le cervelet et le tronc cérébral, mais également les divers nerfs et vaisseaux sanguins. Son second rôle est structurel, fournissant des points d'ancrages pour les muscles et les tendons.

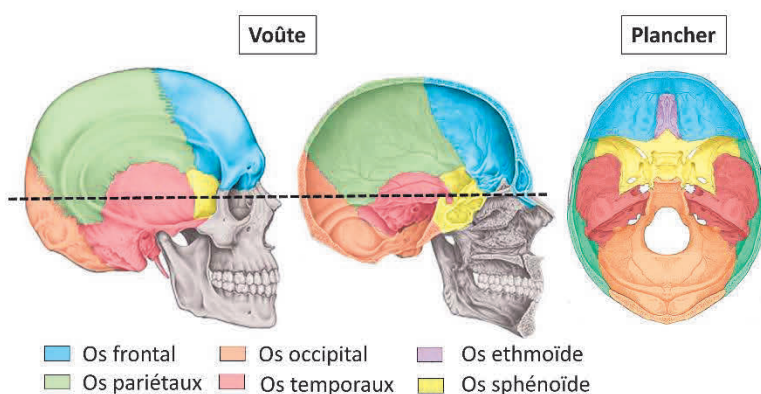


Figure 8. Représentation de la boîte crânienne. La voûte est constituée des os frontaux, pariétaux (x2), occipitaux (x2) et sphénoïde (plan sagittal). Le plancher est composé des os frontaux, ethmoïde, sphénoïde, temporaux (x2) et occipitaux (x2). D'après (Sparke, 2021).

Une fracture de la boîte crânienne peut arriver lors d'un TC par impact direct avec ou sans pénétration de l'objet impliqué dans le choc. Les fractures sont déprimées ou non selon qu'un fragment d'os a été déplacé ou non vers l'intérieur du crâne (embarrure). Des études ont montré que 50 % des patients traumatisés sévères présentaient une fracture, dont 64,1 % sont décédés (Maegle et al., 2019; Tseng et al., 2011). Cela signifie que la fracture est un facteur de risque de mortalité (Tseng et al., 2011). Cependant, 20 à 30 % des TC mortels ne sont pas associés à une fracture (McKee & Daneshvar, 2015). Les fractures du crâne peuvent être associées à des lésions des nerfs crâniens se situant en particulier à la base du crâne (plancher). Le nerf facial est celui généralement endommagé, provoquant une paralysie des muscles faciaux. De plus, ce type de fracture peut impliquer l'oreille moyenne et entraîner des fuites du liquide céphalorachidien (LCR) par l'oreille (otorrhée) et le nez (rhinorrhée). Un patient présentant une fracture du crâne suite à un TC sera plus susceptible de développer une hémorragie sous-arachnoïdienne, sous-durale ou épidurale (Kaur & Sharma, 2018; McKee & Daneshvar, 2015).

II.1.1.c. Lacération et contusion

Les mouvements cérébraux lors du TC conduisent à une déchirure ou à un arrachement des vaisseaux sanguins qui peuvent produire une hémorragie dans l'espace sous-dural. **Une lacération tissulaire** est une déchirure du parenchyme cérébral pouvant accompagner les contusions. Elle peut engendrer des lésions des vaisseaux sanguins, mais aussi des cellules, notamment des axones. Les lésions d'écrasement situées à la surface du cerveau sont nommées **lésions de contusion**. Contrairement aux lacérations, la contusion laisse en principe l'arachnoïde intacte. Elle diffère de l'hématome du fait que le sang est mélangé au tissu cérébral et que les lésions sont vasculaires et tissulaires (Kurland et al., 2012). Ces contusions sont présentes sous la zone de l'impact (coup) ou à distance (au côté opposé de l'impact direct c'est-à-dire au contrecoup) et centrées au cœur du site lésionnel. Ces dommages se produisent dans les zones où le tissu cérébral entre en contact avec des protubérances osseuses irrégulières et sont plus fréquents dans les régions frontales et temporales (McKee & Daneshvar, 2015). Les contusions les plus graves se trouvent au niveau des circonvolutions cérébrales. Elles peuvent également s'étendre jusque dans la substance blanche sous-corticale (substance blanche : composée des axones myélinisés des neurones et de vaisseaux sanguins, reliant les différentes aires cérébrales de la substance grise). Une contusion est une région où le tissu est enflammé avec des dommages vasculaires et tissulaires (Kaur & Sharma, 2018). Les microlésions vasculaires compromettent l'apport en sang. Elles constituent fréquemment un foyer nécrotique, et sont propices aux hémorragies et aux œdèmes (McKee & Daneshvar, 2015; Ng & Lee, 2019). Un phénomène de lésions hémorragiques progressives englobant les hémorragies sous-arachnoïdiennes (HSA), sous-durales et extradurales peut aussi être observé (Adatia et al., 2021). La contusion focale

est un dommage traumatique fréquent, observé chez un patient sur quatre (Maegle et al., 2019) et constitue un facteur important de décès et d'invalidité survenant chez 32 % des TC graves. Elle est une cause de détérioration neurologique du patient (Adatia et al., 2021; Lobato et al., 1983).

II.1.1.d. Hémorragies et hématomes

Le cerveau possède un réseau vasculaire dense et complexe constitué de vaisseaux de différents diamètres allant de l'artère et de la veine, aux artérioles et aux veinules (capillaires). Ce réseau est en relation étroite et directe avec les populations cellulaires (**Figure 9**).

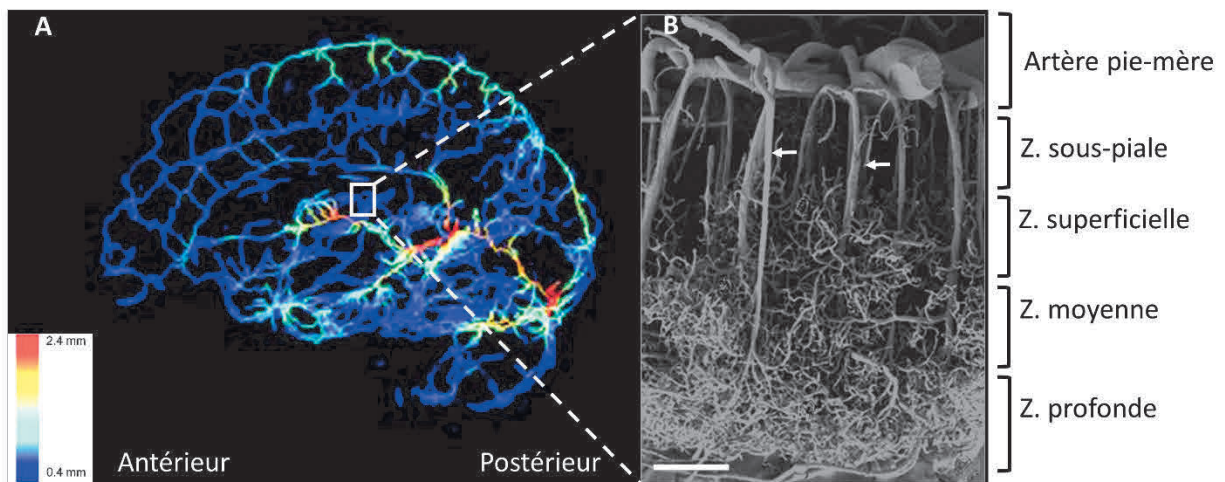


Figure 9. Réseau vasculaire cérébral humain. A. Vue sagittale des vaisseaux sanguins de 0,4 à 2,44 mm de diamètres par reconstruction 3D de cartes réalisées par IRM (d'après (Huck et al., 2019)). B. Organisation vasculaire du cortex temporal avec de haut en bas : l'artère localisée dans l'espace sous-arachnoïdien à la surface de la pie-mère, la zone (z) de capillaires sous-piaux avec les artérioles pénétrantes perpendiculaires à la surface du cortex (flèche blanche), la zone superficielle, la zone moyenne et la zone profonde avec les capillaires. Imagerie par balayage au microscope électronique d'après (Monson et al., 2019). Barre d'échelle = 375 μ m.

Contrairement aux vaisseaux sanguins du reste du corps, cette vascularisation a la particularité d'être composée d'une barrière sélective, la barrière hémato-encéphalique (BHE), qui isole le tissu de la circulation sanguine. Elle est formée par les cellules endothéliales reliées entre elles par des jonctions serrées, par une lame basale composée de collagène IV, de laminine et de fibronectine, et entourée par des péricytes ainsi que des pieds astrocytaires. La BHE contrôle et empêche le passage des molécules sanguines vers le tissu cérébral, à l'exception des éléments nécessaires à son fonctionnement (comme les nutriments) et elle élimine les molécules délétères (déchets et toxines, **Figure 10**).

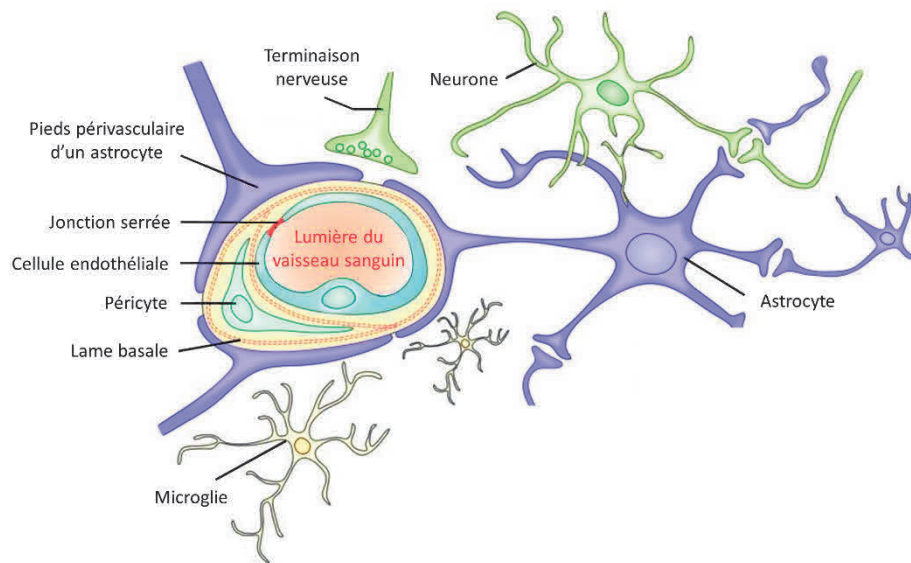


Figure 10. Unité vasculaire et barrière hémato-encéphalique (BHE). La BHE est une barrière sélective formée par les cellules endothéliales reliées par des jonctions serrées, une lame basale, les péricytes et les pieds astrocytaires. Elle isole les composants sanguins du parenchyme cérébral. D'après (Feustel et al., 2012).

Cependant, ces micro-vaisseaux sanguins cérébraux sont fragiles et les atteintes cérébro-vasculaires lors du TC sont fréquentes lors des lésions primaires. En effet, l'hémorragie et la formation d'hématome résultent de la déchirure et/ou de la perméabilité des vaisseaux sanguins. Ces hémorragies peuvent se produire aux niveaux épidural, sous-dural, sous-arachnoïdien, intracérébral et intraventriculaire. L'hématome épidural résulte généralement d'une lacération associée des veines et des artères dures entraînant une détérioration neurologique rapide (Kaur & Sharma, 2018). Il est généralement associé à une fracture du crâne. De plus, les victimes présentent une perte de conscience immédiate après le choc. L'hémorragie sous-durale survient généralement chez les patients traumatisés sévères (Maegle et al., 2019; McKee & Daneshvar, 2015). Elle est accompagnée d'une altération de l'artère piale ou des veines corticales. Le taux de mortalité associé est de 60 à 80 %. Cette pathologie est généralement produite par le phénomène d'accélération et de décélération provoquant une rupture des veines et des artères. L'hémorragie sous-arachnoïdienne est fréquente dans le cas des TC modérés-sévères avec un taux proche de 40 % et peut entraîner la mort ou une invalidité grave malgré une détection et un traitement précoce (Jullienne et al., 2016). De plus, elle peut induire une hydrocéphalie communicante ou non. Dans ce cas, le LCR ne peut plus circuler et s'accumule dans les ventricules cérébraux (Kaur & Sharma, 2018). Les hémorragies peuvent s'accumuler lentement au cours des heures ou des jours suivant la blessure initiale et être détectées ultérieurement en cas de pression intracrânienne élevée et/ou de hernie (McKee & Daneshvar, 2015).

II.1.2. Lésions diffuses

Les forces d'accélération - décélération et de rotation impliquées lors d'un TC conduisent à des perturbations physiques et dynamiques dans le parenchyme cérébral. En effet, par leurs natures viscoélastiques et allongées, les vaisseaux sanguins cérébraux et les axones des neurones sont susceptibles d'être altérées lors du TC (Fрати et al., 2017).

II.1.2.a. Lésion axonale diffuse

Les lésions axonales diffuses (LAD) causées par un TC touchent les prolongements neuronaux qui conduisent le signal électrique du corps cellulaire à la terminaison synaptique (**Figure 11**, schéma de gauche). Elles se développent principalement dans le tissu sous-cortical, le corps calleux et le tronc cérébral. La substance blanche est principalement composée d'axones entourés de gaine de myéline (70 % de lipides et 30 % de protéines), tandis que la substance grise englobe les corps cellulaires neuronaux et gliaux (rapport lipidique et protéique inversé), les synapses et les dendrites (Brady, 2005). La différence de densité entre la substance blanche et la substance grise rend leurs interfaces propices aux forces d'étirement, de cisaillement et de torsion (**Figure 11**) (Pascual & Prieto, 2012). Les parois ventriculaires sont aussi sujettes à ces forces du fait de la présence d'une autre interface, LCR/parenchyme (plexus choroïdien et *blood-cerebrospinal fluid barrier*). Dans la substance blanche, les axones ont principalement une orientation uniforme et parallèle. Ils sont regroupés en faisceaux, ce qui les rend vulnérables aux forces d'étirement et de cisaillement (Fрати et al., 2017). Ce mécanisme de lésion représente 40 à 70 % des cas de TC sévères, nécessitant une hospitalisation (Meythaler et al., 2001; Ng & Lee, 2019; Skandsen et al., 2010). De plus, la LAD est associée à la perte de conscience lors des accidents de la voie publique, voire au coma (Meythaler et al., 2001). La physiopathologie découlant des LAD induit un dysfonctionnement de l'interconnexion des neurones ou une dégénérescence axonale (axotomie amenant à la dégénérescence wallérienne) avec une perte des jonctions synaptiques au cours des 24 h post-TC. La dissociation des connexions et l'accumulation de protéines de transport axonales au niveau de la zone de section peut entraîner un gonflement prolongé des axones lésés. Les neurones lésés par des forces de cisaillement et d'étirement peuvent sécréter des cytokines, des neurotransmetteurs excitateurs comme le glutamate, engendrant un afflux calcique pathologique. Des phénomènes excitotoxiques et apoptotiques peuvent alors se produire pour les neurones mais aussi pour les oligodendrocytes (cellules formant la gaine de myéline entourant les axones). De plus, cela génère des lésions secondaires de LAD, non pas causées par des contraintes physiques, mais par des facteurs biochimiques et moléculaires, notamment par une protéolyse constante médiée par le calcium et d'une accumulation de protéines de transport axonal. Ceci conduit donc à un gonflement prolongé des axones lésés. Il s'ensuit une mort cellulaire apoptotique des

neurones et des oligodendrocytes. Ces LAD persistantes peuvent durer plusieurs mois après le TC, en association avec des hémorragies et des œdèmes cérébraux (Ng & Lee, 2019). Au cours des deux premières années suivant l'apparition des LAD, une dégénérescence de la myéline peut être observée et en résulterait une morbidité associée (Maas, Andrew I. R. et al., 2008; Maxwell et al., 1997; Meythaler et al., 2001). Les patients atteints de LAD après TC sévère présentent peu de récupération, et gardent une invalidité, accompagnée d'une qualité de vie dégradée (Humble et al., 2018; Ma et al., 2016; Mesfin et al., 2020).

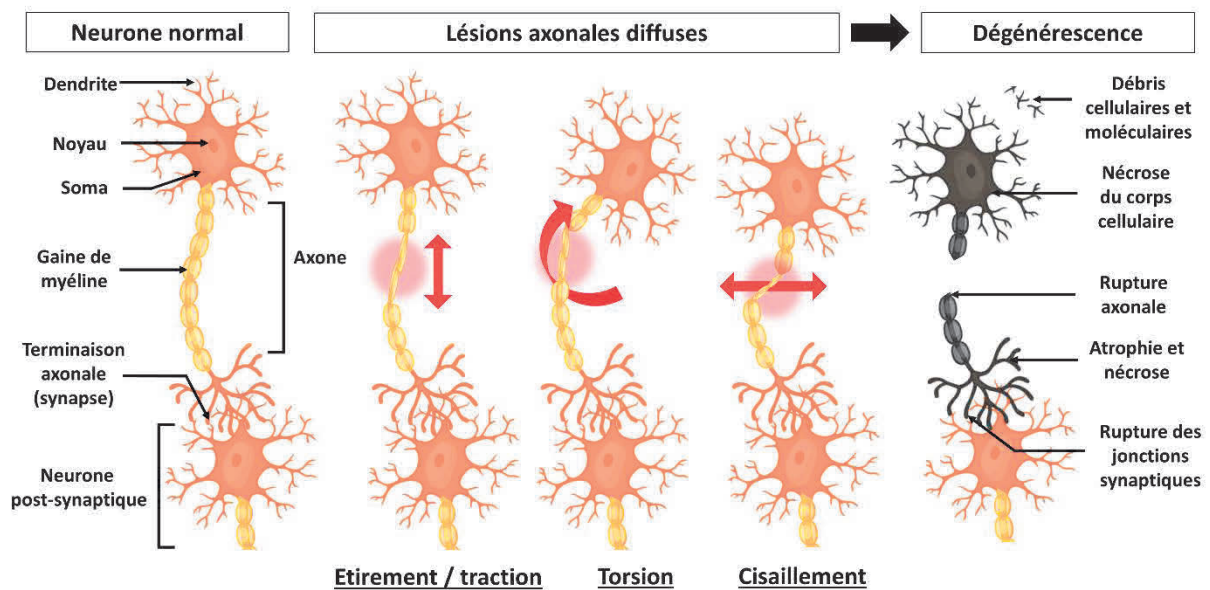


Figure 11. Mécanismes induisant les lésions axonales diffuses. Lors du traumatisme crânien, les axones des neurones peuvent être sujet à différentes forces physiques comme un étirement/une traction, une torsion ou encore un cisaillement. Cela entraîne la dégénérescence de l'axone et du corps cellulaire du neurone, l'atrophie et la nécrose des terminaisons axonales. Ces altérations physiques peuvent aller jusqu'à la rupture des jonctions synaptiques et occasionner la production de débris cellulaires ainsi qu'une libération de neurotransmetteurs, d'ions et de molécules inflammatoires dans le milieu extracellulaire.

II.1.2.b. Hémorragie pétéchiale

Une force d'accélération - décélération rapide peut aussi engendrer des lésions microvasculaires par l'effet de cisaillement. Elles se forment principalement dans la substance blanche. Ces dommages sont responsables de micro-hémorragies appelées hémorragies pétéchiales. Elles peuvent s'épandre en lésion plus importante avec une hémorragie secondaire progressive (Kaur & Sharma, 2018; McKee & Daneshvar, 2015; Ng & Lee, 2019). Ces lésions vasculaires hémorragiques de

cisaillement rendent la BHE vulnérable, c'est-à-dire que les vaisseaux sanguins cérébraux sont déchirés et ne protègent plus le parenchyme contre l'infiltration des molécules périphériques opportunistes (protéines, cellules immunitaires périphériques, etc.).

II.2. Lésions secondaires

Des cascades d'évènements biochimiques, cellulaires et moléculaires vont se développer à la suite des lésions primaires, en phase aiguë mais également de manière chronique après le TC. Ces phénomènes interconnectés sont souvent la conséquence des lésions primaires initiales (Figure 12). Cela suggère une dynamique des lésions cérébrales avec la présence d'un foyer lésionnel local amenant à la perte cellulaire irréversible, mais aussi d'une zone de pénombre dans laquelle le tissu est physiologiquement instable. Cette notion de pénombre traumatique connote d'un potentiel réversible de ces lésions cérébrales secondaires apparaissant au cours des heures, des jours, des mois voire des années après la blessure. Les stratégies thérapeutiques contre ces lésions secondaires comprennent l'optimisation des paramètres systémiques, la surveillance de la pression intracrânienne, l'administration pharmacologique d'agents neuroprotecteurs, et/ou l'acte chirurgical (Lazaridis et al., 2019). Le suivi de ces agressions cérébrales secondaires repose sur la détection de biomarqueurs (molécules inflammatoires, métaboliques comme l'oxygène et le glucose, excitotoxiques, etc.), la neuroimagerie (observation d'hématome, d'œdème, de vasospasme, etc.) ainsi que l'utilisation d'instruments de *monitoring* des paramètres systémiques et cérébraux (capteurs de la pression intracrânienne, Doppler transcrânien, électroencéphalographie, etc.). L'aggravation des lésions secondaires implique deux niveaux d'analyses : **systémique** avec le concept d'agression cérébrale secondaire d'origine systémique (ACSOS), et **local** au sein du foyer et à la périphérie par les lésions secondaires cérébrales. Ces agressions secondaires sont largement répandues dans les TC sévères.

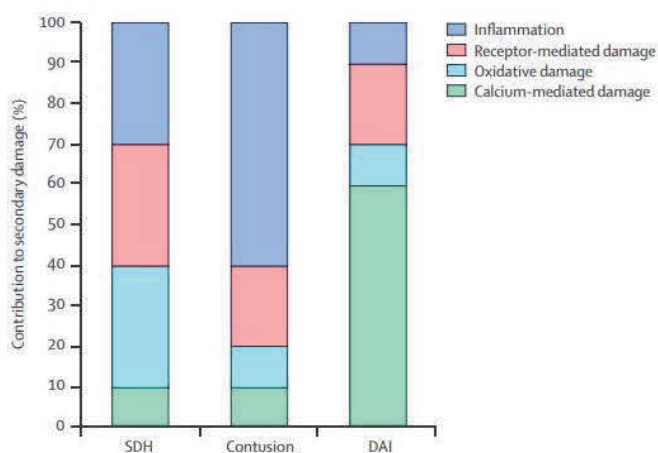


Figure 12. Composantes du traumatisme crânien et importance des différents mécanismes physiopathologiques. Contributions relatives de certaines lésions primaires (abscisse) aux mécanismes physiopathologiques des dommages secondaires. SDH : hématome sous-dural, DAI : lésion axonale diffuse. D'après (Maas et al., 2008).

II.2.1. Désordres systémiques

Les facteurs d'agressions cérébrales secondaires d'origine systémique (ACSOS) peuvent amplifier la souffrance cérébrale initiale du TC, induisant une aggravation du pronostic vital ou fonctionnel du patient. Les ACSOS regroupent les agressions extracrâniennes. Le dénominateur commun de ces facteurs d'ACSOS est l'ischémie cérébrale focale ou globale. En soins intensifs, ces facteurs sont pris en charge pour éviter l'apparition de lésions ischémiques cérébrales, en particulier pour les patients traumatisés sévères (Moeschler et al., 1995).

II.2.1.a. Hypotension et hypoxie

Les deux principaux facteurs d'ACSOS impliqués dans le TC sévère sont : l'hypotension et l'hypoxie. Il est connu depuis les années 70 que l'hypotension et l'hypoxie sont fréquentes après un TC sévère et sont associées à une augmentation de la morbidité et de la mortalité (Price & Murray, 1972). L'hypercapnie (pression partielle de dioxyde de carbone, $\text{PaCO}_2 > 45 \text{ mmHg}$) ou l'hypotension (pression artérielle moyenne, $\text{PAM} < 90 \text{ mmHg}$) sont souvent observées après un TC sévère, et sont liées à une augmentation de la pression intracrânienne (PIC) (Jennett, 1970). La pression de perfusion cérébrale (PPC) est la différence entre la PAM et la PIC. Le débit sanguin cérébral (DSC) correspond au rapport de la PPC sur la résistance vasculaire cérébrale. Ainsi, le DSC et la PPC varient avec la PIC et la PAM. Une hypotension artérielle peut donc réduire le DSC et ainsi restreindre l'apport en oxygène nécessaire pour le métabolisme cérébral. L'hypoxémie, qui est une diminution de la quantité d'oxygène transportée dans le sang, peut également être responsable d'une hypoxie cérébrale (Chesnut et al., 1993). L'hypoxie est une insuffisance des apports d'oxygène par rapport à la demande tissulaire, et se produit pour des pressions partielles en oxygène de l'ordre de 10 à 15 mmHg (Rose et al., 2006). Cependant, il existe un paradoxe concernant l'administration d'oxygène à un cerveau lésé. Une restriction peut produire des lésions hypoxiques cérébrales menant à une ischémie, mais une administration importante pourrait causer une neurotoxicité par la production notamment de radicaux libres, conduisant à une apoptose neuronale et gliale (Becker, 2004). De plus, une hyperperfusion cérébrale peut se développer dans les premiers stades de la lésion et semble tout aussi néfaste que l'ischémie. En effet, une discordance entre le DSC (augmenté) et le taux métabolique cérébral (normal ou diminué) peut amener à une hyperémie (Werner & Engelhard, 2007).

II.2.1.b. Capnie

Afin d'obtenir un DSC adéquat, deux mécanismes s'opèrent : l'autorégulation cérébrovasculaire (vasodilatation et vasoconstriction) et la réactivité au CO_2 (réponse à une hypo- ou

une hypercapnie). Après un TC sévère, ces méthodes de régulations dysfonctionnent, et apparaissent immédiatement ou au cours du temps (**Figure 13**) (Meng & Gelb, 2015; Werner & Engelhard, 2007).

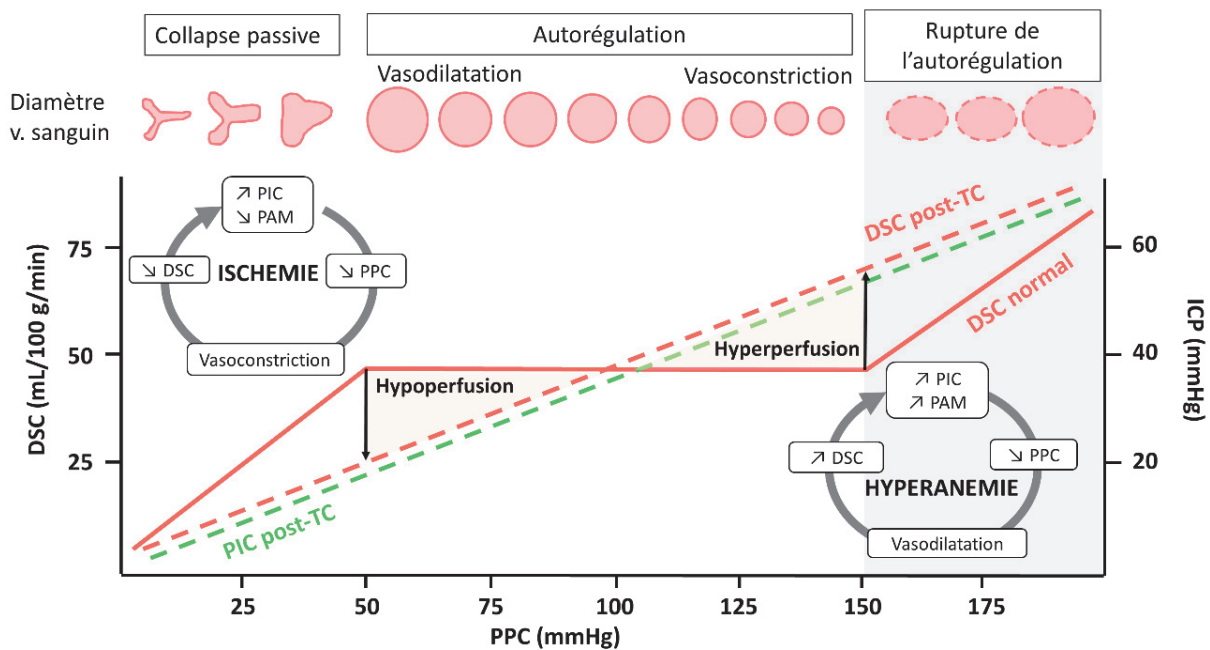


Figure 13. Autorégulation du débit sanguin cérébral chez un individu sain et un patient avec un traumatisme crânien. Dans un cerveau sain, les limites de l'autorégulation physiologique de la pression de perfusion cérébrale (PPC) sont comprises entre 50 et 150 mmHg. La fonction autorégulatrice reste intacte malgré les changements de PPC et une vasodilatation ou une vasoconstriction des vaisseaux sanguins permet de garder un débit sanguin cérébral (DSC, courbe rouge en trait plein) constant proche de 50 mL/100 g/min. En cas de traumatisme crânien sévère, l'autorégulation du DSC (courbe rouge en pointillée) est compromise et devient passive en fonction de la PPC. Lorsque la PPC diminue, le dysfonctionnement autorégulateur entraîne un effondrement du DSC par une perte du tonus des muscles lisses des vaisseaux sanguins, et donc d'une hypoperfusion (et hypotension) et d'une ischémie importante. À l'inverse, lorsque la PPC augmente, cela entraîne une hyperperfusion cérébrale par une dilatation forcée des vaisseaux sanguins et une augmentation de la pression intracrânienne (PIC, courbe verte en pointillée). Ce mécanisme conduit à la formation d'un œdème cytotoxique et vasogénique. Par conséquent, la corrélation entre la PIC et la PPC est linéaire. PAM : pression artérielle moyenne. D'après (Ko, 2013; Roldán & Kyriacou, 2021; Toth, Peter et al., 2016).

Les variations de la capnie, c'est-à-dire de la PaCO_2 , sont responsables des modifications du pH extracellulaire influençant le diamètre des vaisseaux sanguins. La ventilation pulmonaire la corrige. Ainsi, une hyperventilation induit une diminution de la capnie et une alcalose tissulaire, aboutissant à une vasoconstriction. Cela provoque une baisse du DSC et donc de la PIC. Cependant, cette vasoconstriction est un facteur pro-ischémique avec une réduction du DSC, associé à une

augmentation du risque de mortalité (Caulfield et al., 2009; Coles et al., 2007; Dumont et al., 2010). Inversement, une hypoventilation induit une hypercapnie et donc une rétention de CO₂ ainsi qu'une formation d'acide carbonique engendrant une vasodilatation afin d'augmenter le DSC. Toutefois, cette régulation de la capnie est altérée chez les patients traumatisés (Werner & Engelhard, 2007).

II.2.1.c. Hyperosmolarité

Un autre facteur d'agression secondaire est l'anormalité de l'osmolarité plasmatique. La natrémie est la concentration en sodium dans le plasma et témoigne de l'état d'hydratation intracellulaire. Elle est l'un des principaux éléments de l'osmolarité plasmatique, influençant les mouvements d'eau entre le plasma et le tissu cérébral. L'hyponatrémie accroît la teneur en eau intracérébrale et conduit à l'augmentation de la PIC, pouvant amener à un œdème cérébral. À l'inverse, l'hyponatrémie entraîne une hyperosmolarité plasmatique et donc un drainage qui, théoriquement, diminue l'œdème cérébrale et la PIC. Cependant, cet effet est limité dans le temps (Mrozek et al., 2017). Néanmoins, l'application d'une thérapie hyperosmolaire fait débat et certains auteurs signalent qu'elle est peu concluante (Fenn & Sierra, 2019; Kolmodin et al., 2013).

II.2.1.d. Anémie

L'anémie correspond à la diminution anormale du taux d'hémoglobine dans le sang. Une hémorragie traumatique peut induire une anémie, ce qui augmente le risque d'hypoxie. La baisse d'oxygène entraîne une vasodilatation et une tachycardie adaptative afin d'accroître le DSC. Il a été démontré que la transfusion de globules rouges peut augmenter la concentration en oxygène dans le cas du traumatisme crânien sévère. Néanmoins, des études contradictoires indiquent que de telles transfusions sont associées à un mauvais pronostic, ainsi qu'à des complications (Lelubre et al., 2016).

II.2.1.e. Hyperthermie

L'hyperthermie systémique (> 38°C) est fréquente après un TC et peut favoriser les lésions cérébrales secondaires. Elle entraîne une augmentation du métabolisme et de la consommation en oxygène par le parenchyme cérébral. L'hyperthermie est synonyme d'un mauvais pronostic neurologique et d'une mortalité chez les patients ayant un TC sévère. En réanimation, il est préconisé de maintenir une température corporelle comprise entre 35 et 37 °C afin de prévenir l'hypertension intracrânienne (Mrozek et al., 2017). L'hyperthermie entraîne un état d'hypercatabolisme, déterminé par la mobilisation des réserves, et d'une grande dépense énergétique se caractérisant par des perturbations des concentrations de métabolites énergétiques (rapport lactate/pyruvate > 25). L'hyperthermie semble plus fréquente entre 6 à 10 jours après le TC (Svedung et al., 2020). L'utilisation de l'hypothermie thérapeutique dans le cadre du TC a été étudiée dès 1943 (Fay, 1943). Elle semble

être une bonne candidate pour réduire la PIC et aurait également un rôle neuroprotecteur. Cependant, cette stratégie est controversée car son utilisation chez les patients cérébrolésés pouvant produire une augmentation du taux de mortalité (Bouzat & Payen, 2019; Chen et al., 2019; Kuo & Chio, 2012; Shaefi et al., 2016).

II.2.1.f. Glycémie

Le glucose est le principal substrat consommé par les cellules cérébrales qui est acheminé par le sang et dans une moindre mesure par le LCR. Le dysfonctionnement de la BHE engendre une perturbation de la glycémie cérébrale. Une hyperglycémie est fréquemment observée chez les patients traumatisés. De plus, elle est associée à une issue défavorable avec un mauvais pronostic neurologique et une aggravation des lésions (Rovlias & Kotsou, 2000). Il est donc nécessaire de contrôler la glycémie après un TC et de lutter contre l'hyperglycémie. L'insulinothérapie agit dans ce sens. Un contrôle strict de la glycémie dans une gamme de concentration réduite (typiquement 4,4-6,7 mM) ne semble pas améliorer le devenir des patients et pourrait même augmenter la probabilité d'épisodes hypoglycémiques échappant au contrôle, ou de crises métaboliques cérébrales (Hermanides et al., 2018; Oddo et al., 2008; Vespa et al., 2012). Par conséquent, les recommandations actuelles définissent des valeurs optimales de glycémie entre 144 et 180 mg/dL (8-10 mmol/L) (McNett et al., 2014).

II.2.1.g. Bilan

Ces différents facteurs d'agressions cérébrales secondaires (**Tableau V**) sont surveillés en soin intensif afin de les traiter si nécessaire. Ils ont également été intégrés dans le score de pronostic des patients traumatisés notamment celui de l'IMPACT afin de prédire le devenir du patient traumatisé (Steyerberg et al., 2008).

Tableau V. Agressions cérébrales secondaires d'origine systémique (ACSOS) chez l'adulte. SatO₂ : saturation en oxygène de l'hémoglobine circulant dans le sang, PaCO₂ : pression partielle de l'O₂ dans le sang artériel. D'après (Helbok et al., 2018; Schoettker et al., 2001; Signorini et al., 1999).

ACSOS	Seuil pathologique
Pression intracrânienne relevée	≥ 22 mmHg
Pression de perfusion cérébrale	≤ 60 mmHg
Hypotension artérielle (systolique)	≤ 90 mmHg
Hypertension artérielle (systolique)	≥ 160 mmHg
Hypoxémie (SatO ₂)	≤ 90 %
Hypercapnie (PaCO ₂)	≥ 45 mmHg
Hypocapnie profonde (PaCO ₂)	≤ 26 mmHg
Anémie aiguë	≤ 26 %
Hypo- ou hyperglycémie	≤ 4 ou ≥ 10 mmol
Hyperthermie	≥ 38 °C
Tachycardie	≥ 120 bpm
Bradychardie	≤ 50 bpm

II.2.2. Perturbations tissulaires

II.2.2.a. L'hypertension intracrânienne

La boîte crânienne est un espace clos et inextensible contenant le volume cérébral compris en moyenne entre 1 130 et 1 260 mL chez l'adulte (Cosgrove et al., 2007). Ce volume est réparti entre trois compartiments : le parenchyme cérébral (83 %), le LCR (11 %) contenu dans l'espace sous-arachnoïdien et dans les ventricules cérébraux, ainsi que le volume sanguin (6 %). La PIC est influencée par la pression régnant dans ces trois compartiments et est maintenue entre 7 à 15 mmHg chez un adulte sain au repos positionné en décubitus dorsal (Smith, 2008). Le modèle de Monroe-Kellie stipule que le crâne possède un volume constant peu importe la variation des composants, et que la production de LCR et l'apport du sang via la PPC se retrouvent diminués pour compenser l'augmentation de la PIC (Mokri, 2001).

L'hypertension intracrânienne (HIC) est la conséquence d'une élévation pathologique de la PIC. Les lésions traumatiques cérébrales sont une cause fréquente de HIC, car elles induisent la perte des mécanismes de régulation comme l'homéostasie, la régulation du métabolisme, la variation du volume sanguin (ex. cas d'hémorragie) et de la production du LCR. L'HIC est la complication la plus menaçante

chez les patients traumatisés sévères qui entraîne une réduction critique de la PPC et du DSC. Elle est un indicateur de gravité des lésions post-TC par l'existence d'une relation proportionnelle entre la HIC et la mortalité après un TC sévère (Geeraerts & Menon, 2010). Une PIC moyenne supérieure à 20 mmHg au cours des 48 premières heures de surveillance post-TC est un facteur prédictif indépendant de mortalité et des résultats fonctionnels à 6 mois chez les patients traumatisés modérés-sévères (Badri et al., 2012). Par conséquent, le suivi et la gestion du PIC/PPC sont devenus une pierre angulaire dans la prise en charge de ces patients. Différentes méthodes sont employées pour mesurer la variation de la PIC : la mise en place d'un cathéter intraventriculaire couplé à un système de drainage pour le LCR ou un appareillage de surveillance de la PIC par un microtransducteur (fibre optique, dispositifs à jauge de contrainte et capteurs pneumatiques) (Harary et al., 2018).

II.2.2.b. Ischémie cérébrale

En situation physiologique, le débit sanguin cérébral (DSC) moyen est maintenu à 50 mL/100 g/min chez l'homme : 20 mL/100 g/min dans la substance blanche et 80 mL/100 g/min dans la substance grise (Sergio et al., 2016). Des mécanismes d'autorégulations maintiennent le DSC constant par le biais de mécanismes hémodynamiques : (1) le contrôle de la PIC et le maintien de la PPC au niveau macro-vasculaire ; (2) la composante myogénique par la contraction ou la dilatation des muscles lisses vasculaires ; (3) le mécanisme neurogène par l'innervation périvasculaire ; (4) le métabolisme, la réduction du DSC qui va stimuler la libération de substances vasoactives (ex. H⁺, K⁺, O₂) provoquant une vasodilatation ; et (5) les facteurs endothéliaux tels que l'oxyde nitrique dans le cadre d'une vasodilatation (Armstead, 2016; Cipolla, 2009).

Après un TC, le DSC se retrouve diminué de manière hétérogène en raison, par exemple, d'une HIC, d'un œdème, de contusions ou d'une altération vasculaire locale. De tels phénomènes peuvent conduire à une ischémie cérébrale focale ou globale pouvant avoir lieu précocement ou tardivement après le TC et aboutir à une aggravation des lésions secondaires. L'ischémie touche l'ensemble du système nerveux, plus particulièrement la substance grise, qui a une demande métabolique élevée en oxygène (20 % total du corps) et en glucose (25 % total du corps). Les cellules cérébrales sont les plus sensibles à l'hypoxie et à l'hypoglycémie. En effet, cette population cellulaire possède des réserves métaboliques très limitées au niveau des astrocytes et ont besoin de dioxygène pour réaliser l'oxydation métabolique. L'état d'ischémie conduit à une glycolyse anaérobie produisant de l'acide lactique, et une perméabilité membranaire entraînant à la formation d'œdème. En effet, le métabolisme anaérobie peut être insuffisant pour maintenir les besoins énergétiques des cellules, amenant à un épuisement des réserves d'ATP et à l'arrêt des pompes ioniques membranaires qui en dépendent (Kaur & Sharma, 2018). La présence d'une ischémie cérébrale est associée à une issue

neurologique défavorable, à un état végétatif, ou peut mener au décès du patient (Werner & Engelhard, 2007). Dans le cas de l'ischémie, une zone de pénombre subsiste entre le tissu irrigué et le foyer ischémique. Cette aire est en équilibre et peut basculer dans un état non viable pour les cellules, propageant ainsi l'infarctus. Dans le TC, la notion de « pénombre traumatique » est de plus en plus acceptée (Cunningham et al., 2005). Le TC et l'accident vasculaire cérébral (AVC) semblent partager des mécanismes communs, néanmoins des différences majeures existent entre ces deux types d'agressions cérébrales, notamment le seuil critique du DSC. En effet, le seuil engendrant des lésions tissulaires irréversibles est de 5 à 8,5 mL/100 g/min pour les patients atteints d'AVC ischémique et est de 15 mL/100 g/min pour les patients traumatisés (Werner & Engelhard, 2007). Lorsque ce seuil est atteint, une perte cellulaire va être engendrée aboutissant à une atrophie cérébrale.

II.2.2.c. Hémorragies

Comme il a été décrit dans la partie des lésions primaires Introduction, partie II), l'hémorragie est fréquente dans le cas du TC. Elle présente une évolution temporelle au cours des premières heures après le TC pouvant engendrer une augmentation de la PIC et un développement d'une hernie cérébrale. Il est question dans ce cas d'hémorragies post-traumatiques retardées (Nguyen et al., 2016). Des études récentes sur le TC sévère ont montré que 30 à 45 % des patients deviennent coagulopathiques, c'est-à-dire qu'ils présentent une défaillance dans leur mécanisme de coagulation (Harhangi et al., 2008; Lustenberger et al., 2010). L'hémorragie peut se développer au cours des cinq jours après le TC. La coagulopathie explicite ou latente peut conduire à une expansion de l'hémorragie primaire, ou à l'initiation des lésions retardées des vaisseaux sanguins. Un second mécanisme lésionnel implique les micro-vaisseaux dans la zone lésée, la pénombre traumatique, qui reçoivent une énergie cinétique insuffisante pour les rompre, mais suffisante pour les déformer et engendrer une cascade d'évènements moléculaires mécanosensibles inappropriés. Cela aboutit à la formation d'hémorragies pétéchiales. Cette cascade passe par une activation et une translocation nucléaire des facteurs de transcription Sp1 et NF-κB (facteur nucléaire-κB) qui sont mécanosensibles. Ces facteurs de transcription activent l'expression de Sur1, une protéine membranaire formant un pore susceptible de perméabiliser les membranes et d'induire une perméabilisation de la BHE ainsi que des mécanismes nécrotiques dans la paroi des vaisseaux. In en découle une mort nécrotique de ces cellules et donc une fragmentation des capillaires (**Figure 14**). Par la suite, ces hémorragies pétéchiales peuvent fusionner (Kurland et al., 2012).

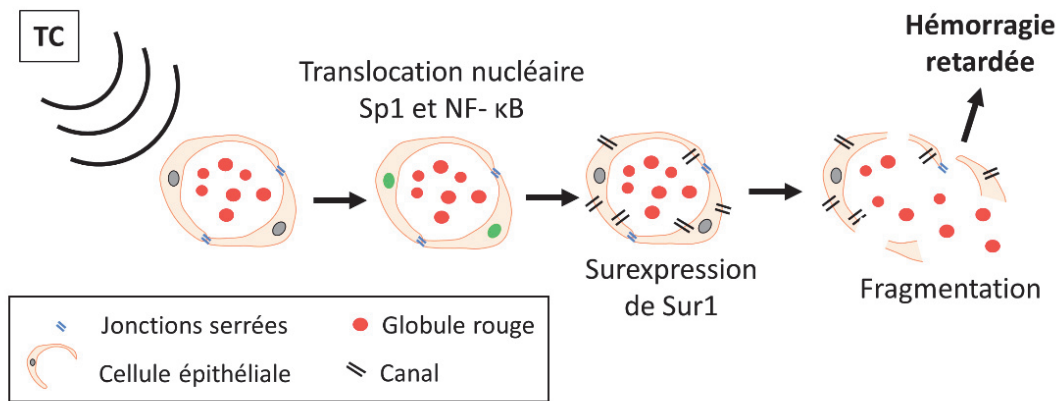


Figure 14. Représentation schématique des évènements moléculaires dans la zone de pénombre post-traumatique expliquant hypothétiquement l'hémorragie retardée. L'énergie cinétique déployée par le traumatisme crânien dans la zone de pénombre va entraîner l'activation et la translocation nucléaire des facteurs de transcription de la protéine Sp1 et du facteur nucléaire-κB (NF-κB). Ensuite, la transcription des protéines Sur1 régulant les canaux $NCa-ATP$ est réalisée dans les cellules endothéliales. Quelques heures plus tard, les canaux nouvellement exprimés ont été insérés dans les membranes plasmalemmales des cellules endothéliales et se sont activés. Les cellules endothéliales subissent une mort cellulaire oncotique (nécrotique), entraînant une fragmentation des capillaires et la formation d'hémorragies pétéchiiales, expliquant l'hémorragie retardée. D'après (Kurland et al., 2012).

II.2.2.d. Vasospasme cérébral

Le vasospasme cérébral est un rétrécissement du calibre des gros vaisseaux cérébraux. Ceci est une complication secondaire fréquente après un TC, en particulier sévère (Yoon et al., 2018). Il survient chez 30 % des patients souffrant d'un TC et 30 % à 50 % des patients atteints d'une hémorragie sous-arachnoïdienne (Jullienne et al., 2016). Le vasospasme favorise l'apparition de lésions cérébrales sévères (Perrein et al., 2015). Il se manifeste entre 2 et 15 jours après le TC. Cinquante pourcents des patients ayant un vasospasme présentent une perturbation hémodynamique, principalement d'une hypoperfusion. Le vasospasme chez les patients traumatisés avec exposition du parenchyme cérébral dure jusqu'à 30 jours tandis que pour un TC fermé sans exposition, il disparaît au bout de 14 jours (Jullienne et al., 2016). Le mécanisme de développement d'un vasospasme est multiple impliquant : la dépolarisation persistante des muscles lisses vasculaires par une diminution des canaux K^+ ; une libération d'endothéline (peptide vasoconstricteur libéré par les cellules endothéliales et les cellules gliales) par la réduction de l'oxyde nitrique ; une diminution de guanosine monophosphate cyclique des muscles lisses vasculaires ; une potentialisation de la vasoconstriction par la

prostaglandine ; et du développement de radicaux libres (Kaur & Sharma, 2018; Perrein et al., 2015; Werner & Engelhard, 2007).

II.2.2.e. Hydrocéphalie post-traumatique

L'hydrocéphalie est classée en forme **obstructive** (non communicante) ou **non obstructive** (communicante). Dans le premier cas, les voies d'écoulement du LCR sont bloquées par un hématome ou par une hémorragie. En conséquence, le LCR s'accumule dans le système ventriculaire provoquant un élargissement des ventricules (dilatation) et une expansion/un étirement des hémisphères cérébraux. Concernant le deuxième cas, l'absorption du LCR est altérée au niveau des villosités arachnoïdiennes. Néanmoins, la communication entre les ventricules et l'espace sous-arachnoïdien persiste. Elle s'accompagne également d'une HIC. L'hydrocéphalie communicante est le type le plus fréquemment observé dans les cas de TC. Les facteurs de risque sont les hémorragies intracrâniennes, en particulier intraventriculaires, l'hémorragie sous-arachnoïdienne (HSA), la méningite, la craniotomie décompressive, la durée du coma et l'âge avancé du patient (Oberholzer & Müri, 2019). L'hydrocéphalie post-traumatique (HPT) est un processus progressif amenant à la détérioration de la santé du patient, mais traitable par l'implantation d'une dérivation qui va drainer l'excès de LCR. Chen *et al.* (2019) ont comparé la survenue de cette pathologie chez des patients ayant un TC seul ou accompagné d'une HSA. Le groupe avec la HSA présentait un risque trois fois supérieur de développer une HPT. De plus, le pic de la survenue de la HPT se trouvait entre 0 et 3 mois après le TC qui est en corrélation avec une autre étude rapportant à 12 semaines post-TC (Yoon et al., 2018). L'arrivée précoce de la HPT se retrouve généralement chez des patients atteints de TC sévères (Yoon et al., 2018). Une étude sur une cohorte de patients traumatisés sévères a montré la survenue de l'hydrocéphalie pour 14,2 % des patients. De plus, 75 % de ces cas apparaissent pendant la phase de réhabilitation, jusqu'à un an après le TC (Kammersgaard et al., 2013).

II.2.2.f. Œdèmes cérébraux

La formation d'œdèmes est fréquente après un TC. L'œdème cérébral est lié aux dommages structurels ou au déséquilibre hydrique et osmotique causé par les lésions primaires ou secondaires. Ce phénomène correspond à l'accumulation anormale de fluide et d'électrolytes dans les cellules et dans leur espace interstitiel environnant. Ce processus provoque un gonflement cérébral et/ou cellulaire amenant à un dysfonctionnement cérébral associé à une augmentation de la PIC et des mécanismes ischémiques secondaires (Unterberg et al., 2004). Trois types d'œdème sont retrouvés après le TC et entraînent des déficits secondaires : l'œdème vasogénique (extracellulaire), l'œdème cytotoxique (intracellulaire) et l'œdème ionique (extracellulaire). Cependant, il est de plus en plus reconnu que ces processus peuvent être interdépendants (Jha et al., 2019).

L'œdème cérébral vasogénique est causé par une perturbation mécanique ou d'une dégradation fonctionnelle des cellules endothéliales constituant les vaisseaux sanguins cérébraux, plus particulièrement la BHE (Marmarou et al., 2000). Quelques minutes après la lésion initiale, un œdème anoxique survient suite à la carence d'énergie (oxygène et nutriment) causée par l'altération du réseau vasculaire. Le contrôle des gradients est affecté, ce qui entraîne une entrée d'eau et donc un gonflement cellulaire notamment des astrocytes et des dendrites neuronales. Puis rapidement, l'œdème ionique survient affectant les gradients ioniques dans les cellules endothéliales (Jullienne et al., 2016). Dans une deuxième mesure, des cascades vont se mettre en place en favorisant une fuite de la BHE avec l'implication de cytokines pro-inflammatoires, des facteurs angiogéniques, la dégradation des jonctions serrées, des facteurs favorisant l'extravasation des protéines et des réarrangements du cytosquelette (Jha et al., 2019). Suite à cette perméabilité de la BHE, un transfert ionique de protéines dérivées du plasma et de cellules circulantes incontrôlées s'effectuent des compartiments intravasculaires vers le milieu extracellulaire dans le parenchyme cérébral. Par conséquent, ce mécanisme induit une augmentation du volume de l'espace extracellulaire (Werner & Engelhard, 2007).

L'œdème cérébral cytotoxique (œdème cellulaire) est caractérisé par une augmentation de la teneur en eau intracellulaire, donc d'un gonflement des neurones, des astrocytes et de la microglie indépendamment de l'intégrité de la BHE. Cela induit des modifications du gradient osmotique cellulaire avec une incapacité des cellules à régler l'osmolarité. L'eau se déplace du milieu interstitiel (extracellulaire) vers l'espace intracellulaire. Trois mécanismes peuvent intervenir : (1) l'augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire aux ions sodiques (Na^+) et potassiques (K^+), (2) un épuisement énergétique pour contrôler les pompes ioniques comme les pompes Na^+/K^+ , et (3) la réabsorption cellulaire des solutés osmotiques actifs (Jha et al., 2019; Kaur & Sharma, 2018). Toutefois, cet œdème est surtout responsable d'une redistribution de l'eau et des ions du compartiment extracellulaire vers le compartiment intracellulaire. L'œdème ionique, quant à lui, serait responsable du gonfflement tissulaire.

L'œdème ionique est souvent associé à l'œdème cytotoxique car il survient suite à une atteinte hypoxique (cas d'ischémie) ou une lésion cellulaire. Tout comme l'œdème cytotoxique, la BHE reste intacte et les capillaires sanguins gardent une certaine intégrité pour que le sang puisse circuler. Un gradient de concentration de Na^+ est produit depuis la lumière du capillaire, à travers l'endothélium et dans l'espace extracellulaire. Ainsi, le sodium est transporté dans le milieu extracellulaire, entraînant avec lui du chlorure (gradient électrochimique) et de l'eau (gradient osmotique). Cela aboutit à un gonfflement tissulaire (Jha et al., 2019; Stokum et al., 2016).

II.2.3. Perturbations cellulaires

II.2.3.a. Excitotoxicité

L'excitotoxicité est l'un des événements secondaires majeurs contribuant à la mort neuronale et à l'apoptose après un TC (Guerriero et al., 2015). Ce mécanisme est principalement lié à une augmentation des concentrations extracellulaires en acides aminés excitateurs comme le glutamate au sein du système nerveux central, ainsi qu'à des dysfonctionnements de régulation du calcium intracellulaire.

Physiologiquement, le glutamate est libéré dans les fentes synaptiques par les neurones, puis rapidement recapturé par les transporteurs dépendant du Na^+ des neurones (EEAC-1) ou des astrocytes (GLAST). Cette molécule est le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central (Meldrum, 2000). Il peut activer différentes familles de récepteurs comme les récepteurs ionotropiques N-méthyl-D-aspartate (R-NMDA) ou les récepteurs alpha-amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate (R-AMPA), mais aussi des récepteurs métabotropiques. Le R-NMDA est un tétramère de combinaison de sous-unités GluN1 (omniprésente), GluN2 ou GluN3. La sous-unité NR2 présente quatre sous-types (GluN2A, B, C ou D). Les R-NMDA contenant la GluN2A se trouvent principalement au niveau synaptique, tandis que les R-NMDA avec la GluN2B sont plutôt localisés en extrasynaptique et dont leur activation entraîne des mécanismes préjudiciables pour la cellule (Chen et al., 2007). L'activation du R-NMDA nécessite la liaison d'un co-facteur (glycine ou D-sérine) sur la GluN1 et la dépolarisation membranaire préalable pour enlever l'ion de magnésium bloquant le canal. Suite à cela, le canal est perméable aux ions Na^+ et Ca^{2+} , essentiels à la neurotransmission. Néanmoins, un excès de glutamate extracellulaire va engendrer une entrée massive de Ca^{2+} dans la cellule post-synaptique induisant un œdème cytoplasmique et une dépolarisation de la membrane mitochondriale jusqu'à la rompre. L'ATP ne peut plus être synthétisée et des radicaux libres vont se former. De plus, le cytochrome C est libéré dans le cytoplasme déclenchant la cascade apoptotique. Par ailleurs, le Ca^{2+} peut activer l'oxyde nitrique synthase neuronale qui produit le monoxyde d'azote (NO) en grande quantité et participe au stress oxydant, pour aboutir à la mort cellulaire (Guerriero et al., 2015). Des études de microdialyse chez l'homme et l'animal ont démontré une augmentation immédiate du glutamate extracellulaire suite à un TC sévère. Cette augmentation est enregistrée à partir de 24 h post-TC et ceci jusqu'à quatre jours (Chamoun et al., 2010).

En plus de ce mécanisme, l'excitotoxicité pourrait être médiée par d'autres phénomènes. Singh *et al.* (2012) ont étudié la mécanosensibilité des R-NMDA par le rôle médiateur de GluN2B. Les auteurs suggèrent que la réponse d'étirement mécanique agit comme un modulateur du récepteur et

aboutit à un influx calcique. Ce mécanisme est intéressant et pourrait être impliqué dans le cadre des TC lors des lacérations ou des lésions axonales diffuses.

Une autre hypothèse se tourne vers le stockage du calcium dans le réticulum endoplasmique. Le Ca^{2+} est transporté dans ce compartiment cellulaire par la pompe membranaire SERCA qui va attirer deux ions calciques pour chaque molécule ATP hydrolysée, produisant un gradient de concentration calcique entre le réticulum endoplasmique et le cytosol de la cellule. La libération de Ca^{2+} s'effectue par deux principaux canaux : les récepteurs de la ryanodine (RyR) activés lors d'une dépolarisation neuronale et les récepteurs de l'inositol-1,4,5-trisphosphate (IP 3 R). Dans les conditions excitotoxiques du TC, les neurones subissent une excitation et une dépolarisation massives et continues. Il est ainsi suggéré dans ce cas de figure que le canal calcique de type L interagit avec le récepteur RyR, procédant à une libération de Ca^{2+} . Cet excès calcique favorise l'excitotoxicité (Tehse & Taghibiglou, 2018).

Les mécanismes d'excitotoxicités pourraient engendrer tardivement des déficits dans le fonctionnement cognitif, moteur et dans la plasticité (Graham et al., 2020).

II.2.3.b. Le stress oxydant et nitrosatif

La production excessive de radicaux libres est un mécanisme pathologique délétère retrouvé dans le TC. À l'état physiologique, les espèces réactives à l'oxygène (ROS) comme les radicaux libres d'oxygène, le superoxyde, le peroxyde d'azote, d'oxyde nitrique, le peroxyde d'hydrogène ou encore le peroxyde nitrique sont produits en permanence et en faible quantité lors de la respiration et du métabolisme cellulaire. Le système endogène antioxydant convertit et neutralise les ROS en dérivés moins toxiques pour les cellules (Zhang et al., 2016). Le stress oxydant est le terme employé pour décrire un déséquilibre intracellulaire entre la production excessive d'espèces réactives oxygénées (ou radicaux libres) et leur dégradation. Il est favorisé par une surcharge calcique intracellulaire (en particulier au niveau mitochondrial) notamment lors du processus excitotoxique, qui stimule la production de ROS par leurs enzymes de synthèse (ex. cyclo oxygénase, oxyde nitrique synthase). Lorsque les antioxydants endogènes ne suffisent plus à inactiver la production de ROS, une augmentation de la peroxydation des lipides membranaires cellulaires, mitochondriales et nucléaires, ainsi que l'oxydation et la nitration des protéines enzymatiques engendrent des dysfonctionnements mitochondriaux et une cassure des acides nucléiques. Cela aboutit à une fragmentation de l'ADN. De plus, l'excès de radicaux libres peut engendrer la destruction de la BHE, l'activation de voies de signalisation pro-inflammatoire, de l'apoptose et de la nécrose (Kaur & Sharma, 2018; Rana et al., 2019). Ces radicaux libres ont un rôle majeur dans les lésions secondaires traumatiques, notamment celles liées à l'œdème cérébral et à l'ischémie.

II.2.3.c. Inflammation

L'inflammation est une réaction défensive menée par le système immunitaire afin de protéger l'organisme contre un stimulus nuisible d'origine biologique, physique ou chimique. Elle est constituée de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. Les voies stimulées du système immunitaire font intervenir différents acteurs. Une activation, une prolifération et une migration de la microglie vers le site de la lésion sont induites quelques minutes après le TC. Les cellules microgliales sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, ainsi que d'autres composants neurotoxiques générant des radicaux libres. Des neutrophiles sont également recrutés dans la zone impactée pour phagocyter et éliminer les débris cellulaires (McKee & Daneshvar, 2015). L'inflammation a un double rôle sur le tissu cérébral avec un effet bénéfique en favorisant la régénération et la protection des neurones ; par contre, elle contribue aux dommages secondaires et à la perte neuronale par une activation accrue du système immunitaire (Cederberg & Siesjö, 2009). Il est établi que la forme et la fonction microgliale sont fortement liées. Les cellules microgliales possèdent un large spectre de phénotypes qui sont exprimés suivant les types de stimuli qu'elles reçoivent (Norden et al., 2015). Conventionnellement, deux formes prédominent : le type M1 qui est pro-inflammatoire avec la libération de ROS, TLR et de TNF- α ; et le profil M2 qui est anti-inflammatoire avec la production d'interleukine 10 et de TGF- β (Orihuela et al., 2016). La microglie est un type cellulaire clé car elle peut s'activer pendant des semaines, voire des années après le TC (Salehi et al., 2017). En phase aiguë, elle est rapidement activée en réponse aux signaux émis par les cellules endommagées. La microglie va migrer vers les régions lésées afin d'éliminer les débris cellulaires et moléculaires via un processus de phagocytose. Cette phase est essentielle dans la restauration de l'environnement cérébral. À cela, ces cellules pourraient limiter l'hyperexcitabilité des neurones lésés ou axotomisés. L'activation microgliale induite par les lésions primaires traumatiques peuvent stimuler la libération ciblée de facteurs de croissance aux neurones lésés. La libération de médiateurs cellulaires impliquant les cytokines pro-inflammatoires, les prostaglandines, les radicaux libres et le complément vont stimuler les chimiokines et les molécules d'adhésion (ICAM-1 et VCAM-1, molécules d'adhésion intercellulaire et vasculaire), et donc mobiliser les cellules immunitaires et gliales de manière parallèle et synergique. De plus, le dysfonctionnement de la BHE permet également aux neutrophiles, aux monocytes et aux lymphocytes circulants de s'infiltrer dans le parenchyme cérébral lésé. L'adhérence des leucocytes et des plaquettes accentuent également la destruction de la micro-vascularisation et le processus inflammatoire contribue à l'élimination des tissus adjacents lésés en quelques heures jusqu'à quelques semaines. Enfin, les astrocytes produisent des microfilaments et des neutrophines afin de synthétiser un tissu cicatriciel au site des lésions cérébrales. Quelques heures après la blessure, les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , interleukine $-\beta$ et -6) sont fortement exprimées. Cela conduit à une

progression des dommages tissulaires liées à une décharge de médiateurs neurotoxiques, de cytokines ou d'oxyde nitrique (Kaur & Sharma, 2018; Werner & Engelhard, 2007). Cette inflammation chronique est associée à l'aggravation des lésions secondaires après un TC (Shaefi et al., 2016). La neuroinflammation prolongée et retardée recrute les macrophages, active la microglie et peut durer plusieurs années (Ng & Lee, 2019).

II.2.3.d. Mort cellulaire

Suite aux différentes cascades moléculaires activées lors du TC, les cellules en souffrance vont mourir. Il existe au moins deux types de mort cellulaire qui peuvent intervenir après un TC, aussi bien en phase précoce que tardive : la nécrose et l'apoptose (Werner & Engelhard, 2007).

La nécrose fait suite à un dommage tissulaire important causé par l'action mécanique du TC ou d'une ischémie/hypoxie. Elle survient tôt après le TC. Elle est caractérisée au niveau microscopique par un gonflement cellulaire. Il en résulte une production massive de glutamate, favorisant l'entrée des ions Ca^{2+} en intracellulaire. Par la suite, cet influx calcique va stimuler les phospholipases, les protéases et les peroxydases lipidiques qui vont induire une atteinte des organelles cytoplasmiques, une hydrolyse aléatoire de l'ADN, l'autolyse des membranes biologiques et une stimulation de l'inflammation pour éliminer les débris cellulaires par les cellules phagocytaires (Kaur & Sharma, 2018).

Contrairement à la nécrose, l'**apoptose** est dépendante de l'énergie et donc ne se produit qu'en présence d'ATP. Cela sous-entend que les mitochondries sont fonctionnelles. La nécrose interviendra lors d'une destruction mitochondriale et d'une déplétion énergétique (Andriessen et al., 2010). L'apoptose décrit un phénomène de mort cellulaire programmée qui se caractérise par l'activation d'enzymes cataboliques, la néosynthèse de protéines apoptotiques (caspases) et la destruction cellulaire. Il existe une voie caspase-indépendante liée à la libération de ROS et de protéines mitochondriales (ex. AIF, Smac/DIABLO) qui sont transloquées dans le noyau et induisent une fragmentation de l'ADN. Cette cascade apoptotique peut être initiée par l'activation de calpaïnes qui induisent la protéolyse des protéines du cytosquelette (ex. spectrine, protéine NF). Deux autres voies apoptotiques sont quant à elles médiées par les caspases. La voie extrinsèque est activée par un signal extérieur à la cellule, un ligand (Fas, TNF) qui va se fixer sur un récepteur de mort membranaire. Par exemple, les macrophages stimulés vont sécréter des cytokines comme le TNF- α . Elles vont activer les récepteurs TNFR1 ou TNFR2 se trouvant à la surface de la cellule cible ainsi qu'une cascade de signalisations passant par la caspase 8. L'apoptose peut aussi se réaliser par la voie intrinsèque via la protéine Bid (Rana et al., 2019). La voie intrinsèque met en jeu la mitochondrie. Elle est initiée par un stress cellulaire ou par des lésions de l'ADN qui active le facteur de transcription p53. L'activation de cette voie repose sur la perméabilisation de la double membrane mitochondriale. Ainsi, le

cytochrome c (protéine interne) est libéré dans le cytosol et va s'associer à APAF1 et la pro-caspase 9, formant ainsi l'apoptosome dépendant de l'ATP. La caspase 9 est activée au sein d'un complexe et est capable d'activer des caspases effectrices comme la caspase 3, aboutissant au clivage de protéines cytosoliques et nucléaires.

Ces deux voies apoptotiques entraînent donc l'activation des caspases 3, 6 et 7 provoquant une fragmentation contrôlée de l'ADN (**Figure 15**). La caspase 3 joue un rôle important dans la perte neuronale induite par une lésion post-TC (Jarrahi et al., 2020; Ng & Lee, 2019). L'implication de l'apoptose neuronale après le TC est bien connue, mais la voie de signalisation apoptotique sous-jacente n'est pas aussi bien élucidée (Zhang et al., 2005). Des dosages de LCR chez des patients traumatisés sévères ont montré une activation prolongée des protéines pro- et anti-apoptotiques avec un pic cinq jours avec le TC (Uzan et al., 2006).

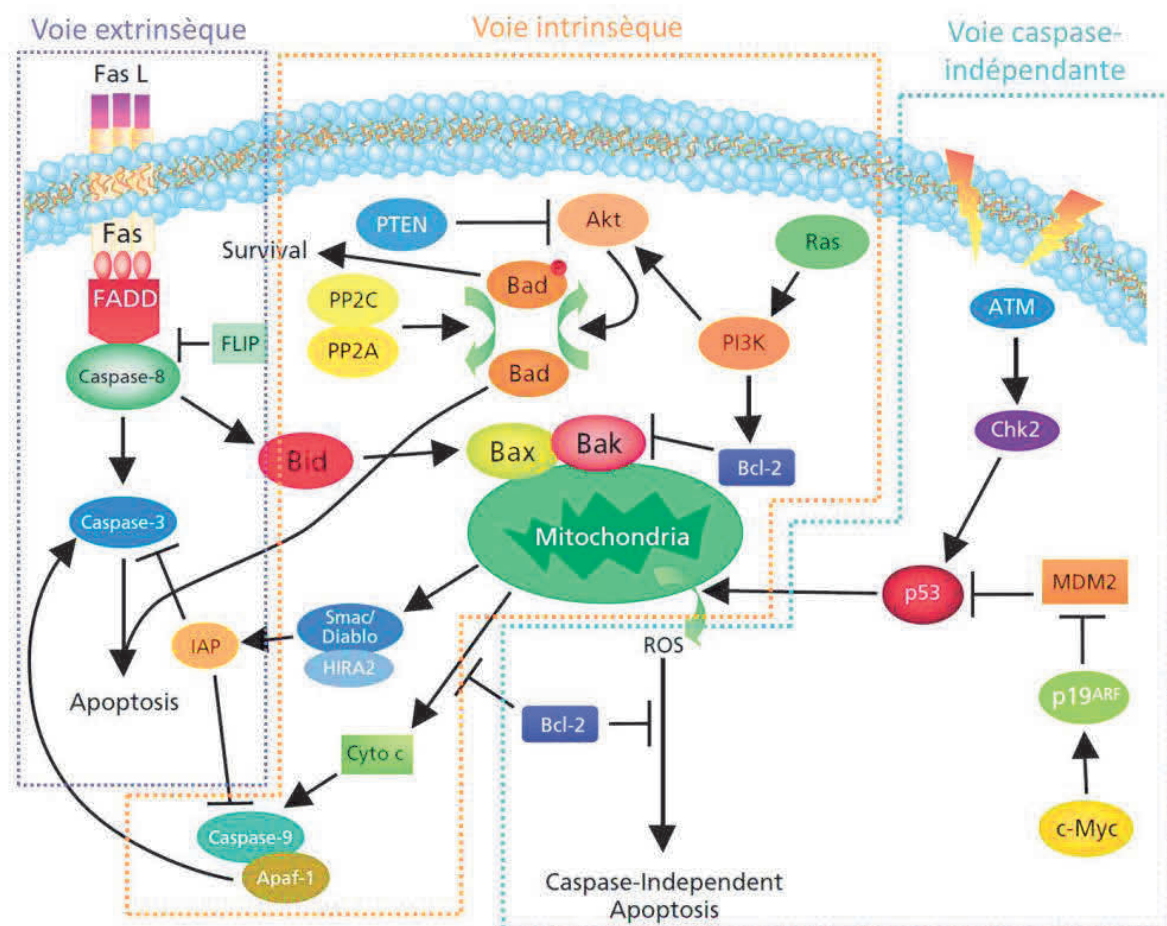


Figure 15. Voies de signalisations de l'apoptose cellulaire. Représentation des deux voies « caspase dépendante » avec la voie extrinsèque (partie de gauche) et la voie intrinsèque (partie du milieu), ainsi que la voie caspase indépendante (partie de droite). D'après <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/cell-biology-products.html?TablePage=9560323>.

D'autres voies cellulaires sont également activées à la suite du stress calcique et aboutissent à des lésions neuronales (Rana et al., 2019).

L'**autophagie** est un processus physiologique et intracellulaire qui dégrade les protéines cytoplasmiques et les organites des cellules en état de stress ou privées de nutriment. Ce mécanisme est essentiel pour maintenir le métabolisme indispensable à la survie des cellules. Il existe trois types d'autophagies : la microautophagie, la macroautophagie et l'autophagie médiée par des protéines chaperonnes. L'autophagie est activée après un TC et semble avoir un double rôle : protecteur ou délétère. Ce processus a surtout été observé et étudié dans des modèles *in vivo* de TC (Zhang & Wang, 2018).

II.2.3.e. Astroglie et plasticité

Les astrocytes forment la population gliale résidente la plus abondante dans le cerveau. En condition physiologique, ces cellules sont impliquées dans l'homéostasie et le contrôle du flux sanguin. De plus, elles jouent un rôle important dans la libération de facteurs neurotrophiques et de gliotransmetteurs, ainsi que dans la régulation du métabolisme énergétique. La dégénérescence des cellules neurales et gliales, la dégradation vasculaire et la réponse immunitaire conduisent à l'astroglie réactive. Le mécanisme d'astroglie est caractérisé par une hypertrophie des astrocytes. Cette réponse est graduelle et hétérogène. De plus, les cellules gliales jouent un rôle protecteur dans la périphérie des lésions, en régulant les niveaux de glutamate extracellulaire et en prévenant l'excitotoxicité. Les astrocytes prolifèrent et s'entrelacent à la périphérie de la lésion cérébrale en formant une cicatrice gliale qui entoure les zones de lésions et limite la propagation de la réponse inflammatoire (Ladak et al., 2019). Ce mécanisme est présent dans les zones contenant peu ou pas de neurones viables (Burda et al., 2016). Ce processus cicatriciel implique non seulement les astrocytes mais également les oligodendrocytes, les cellules méningées, la microglie et les fibroblastes (Ng & Lee, 2019). Les astrocytes peuvent affecter l'activité neuronale, moduler la plasticité ou participer à la régénération du tissu cérébral. Toutefois, cette population gliale semble avoir un double rôle dans la neurogenèse, la synaptogenèse, la plasticité et l'angiogenèse après un TC. En effet, les astrocytes peuvent favoriser ces processus ou à l'inverse, avoir une action délétère, suivant leur microenvironnement et la libération de certains facteurs dérivés. De plus, la glie cicatricielle est un obstacle à la régénération axonale et à la récupération de la connectivité neuronale par la production d'inhibiteurs de croissance de ces cellules et par la mise en place d'une barrière physique et chimique de celles-ci (Zhou et al., 2020).

II.2.4. Activités cérébrales anormales

L'activité neuronale est généralement altérée après un TC soit à cause de l'agression cérébrale, soit par l'administration des médicaments sédatifs dans les unités de soins intensifs. L'épilepsie post-traumatique (PTE) et les dépolarisations corticales envahissantes (DCE) sont des manifestations transitoires qui nécessitent une grande quantité d'énergie aux cellules pour revenir à un état physiologique. De plus, ces phénomènes entraînent une libération de glutamate excessive pouvant accentuer l'excitotoxicité. La PTE et les DCE peuvent donc aggraver les mécanismes secondaires délétères après le TC.

II.2.4.a. *Activité épileptique*

Après un TC sévère, le réseau électrique du tissu cérébral est lésé, ce qui est propice aux crises épileptiques. L'épilepsie est définie par des crises spontanées récurrentes dues à une activité électrique synchrone incontrôlée dans le cerveau. Ceci induit des manifestations motrices, sensorielles et psychologiques anormales. Le TC peut provoquer des crises post-traumatiques au cours des jours suivant le TC, qui augmentent la susceptibilité aux crises ainsi que l'incidence de l'épilepsie au cours des années suivantes. Il faut en effet distinguer la PTE des crises répétées au stade précoce après un TC : (1) les crises immédiates surviennent généralement dans les 24 h suite à la blessure, (2) les crises précoces arrivent au cours de la semaine après le TC et (3) les crises tardives sont celles apparaissant plus d'une semaine après le TC. Le risque de récurrence après une seule crise post-traumatique est supérieur à 70 %, suggérant qu'une seule crise suffit pour prédire l'installation d'une PTE (Ding et al., 2016). Chez les adultes, la présence d'un hématome intracérébral a été associée à un risque plus élevé de développer une PTE, tout comme les blessures pénétrantes et les fractures crâniennes déprimées (Webster et al., 2017). De plus, ce risque est corrélé à la sévérité du TC. En effet, plus de 50 % de personnes développent une PTE après un TC sévère et dont 40 % subissent leur première crise dans les 6 mois (Sharma et al., 2021).

Différents mécanismes, notamment inflammatoires, peuvent engendrer des crises spontanées (Mukherjee et al., 2020). La surexpression du TNF- α par les astrocytes, les neutrophiles et les cellules microgliales lors de la réponse inflammatoire conduit à une hyperexcitabilité synaptique (Ladak et al., 2019). Trois principales voies de signalisation sont impliquées dans l'épileptogenèse suite au processus d'inflammatoire. La première découle de la perméabilité de la BHE avec une infiltration de protéines circulantes comme l'albumine (Weissberg et al., 2015). La deuxième est médiée par le TGF- β libéré de la matrice extracellulaire par des protéases. L'albumine et le TGF- β se lient aux récepteurs membranaires TGF- β 1 et 2 et vont engendrer une libération de cytokines. La dernière voie provient de la libération de HMGB1 et IL-1 β suite à la lésion cellulaire, par les neurones nécrotiques, la microglie

et les astrocytes activés. Ces molécules vont se lier également aux récepteurs membranaires et impliquer une cascade de signalisation qui va produire diverses molécules neurotoxiques (**Figure 16**) (Webster et al., 2017).

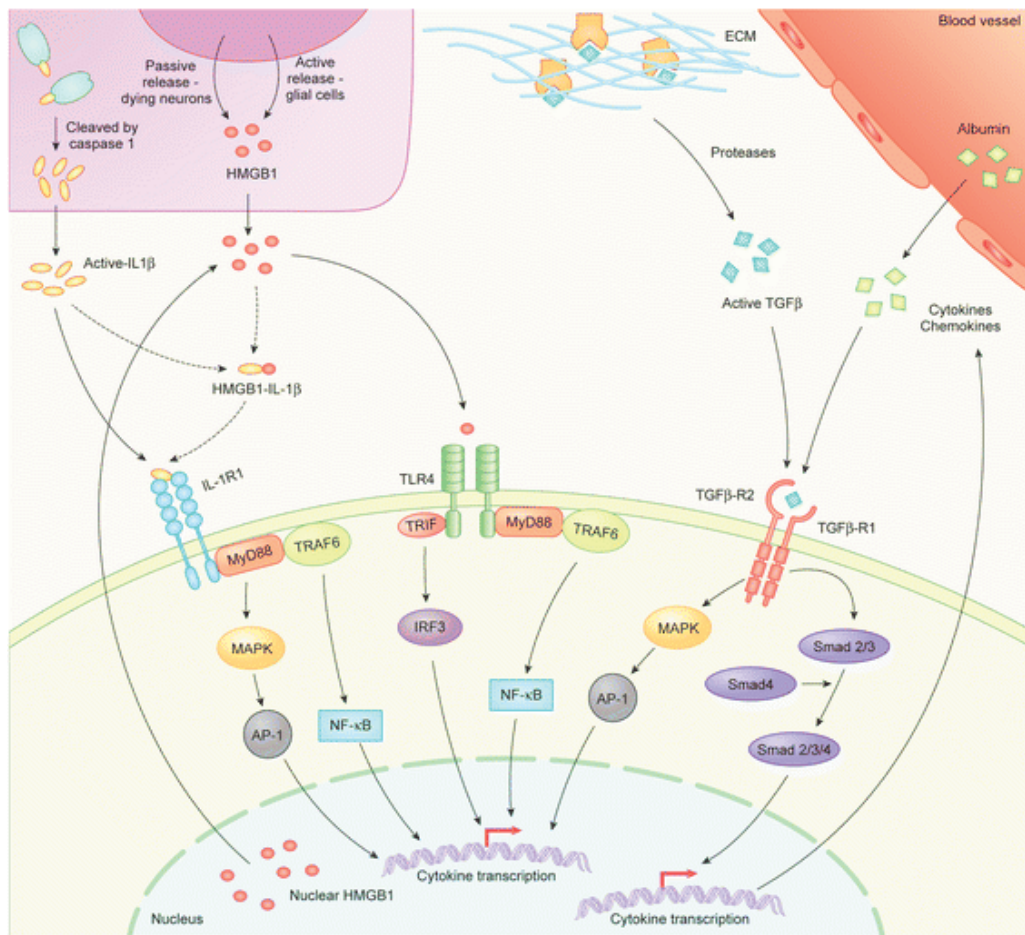


Figure 16. Résumé de trois cascades de signalisation clés qui peuvent faire le lien entre l'inflammation et l'épileptogenèse. Le premier mécanisme rapporte la libération de HMGB1 et/ou de l'interleukine β qui vont activer les récepteurs TLR ou la voie indépendante de MyD88. Le second mécanisme est actionné par le facteur de croissance TGF- β et la dernière par la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique avec l'infiltration de l'albumine. Ces deux dernières molécules vont actionner la cascade passant par les récepteurs TGF- β . Ces différentes voies régulent la réponse immunitaire et peuvent engendrer une hyperexcitabilité de la cellule cible. D'après (Webster et al., 2017).

II.2.4.b. *Dépolarisations corticales envahissantes*

En 1944, Aristides Leão a étudié la propagation de l'activité épileptique dans le cortex cérébral. Il avait abordé le problème en appliquant une stimulation électrique au cortex frontal de lapins

anesthésiés et avait enregistré les phénomènes à partir d'un réseau d'électrodes corticales placé postérieurement à la stimulation. Au lieu d'observer une activité épileptique, il a mesuré une période de silence électrique au niveau des premières électrodes proches du site de stimulation. Cette dépression de l'activité se propageait le long de l'hémisphère cérébral à une vitesse de 2 à 5 mm/min. Au bout de 5 à 15 min, l'activité électrique corticale reprenait (Leao, 1944). Ce phénomène a été baptisé : dépolarisation corticale envahissante (DCE ou *spreading depression*). Durant de nombreuses années, les DCE n'ont pas été observées en clinique par électroencéphalographie du cuir chevelu, laissant penser qu'elles n'étaient qu'un artefact se produisant en conditions expérimentales dans les cerveaux des rongeurs. Malheureusement, la technique employée n'était pas assez sensible en raison de la haute capacitance de la dure-mère et du crâne pour enregistrer les DCE d'une zone corticale étroite (Yağmur et al., 2019). La technique d'électrocorticographie sous-durale couplée à l'enregistrement des basses fréquences (DC ECoG) a permis de détecter les DCE chez des patients cérébrolésés. Elles surviennent dans plusieurs conditions pathologiques comme la migraine, l'accident vasculaire cérébral, l'ischémie cérébrale retardée après HSA, l'hématome intracérébral et le TC (Dreier et al., 2016; Yağmur et al., 2019). Leur apparition dans la migraine suggère qu'elles sont relativement bénignes (Dreier et al., 2015). Néanmoins, elles surviennent chez plus de 56 % des patients TC sévères et elles sont associées à un mauvais pronostic (Hartings et al., 2011; Stocker, 2019). Ainsi, les DCE semblent un critère de sévérité du TC. Les schémas d'apparition des DCE varient d'un patient à un autre. Un seul évènement peut être observé (DCE isolée) ou un groupe de DCE répétées (clusters) soit dans les heures suivant le TC, soit après 5 à 7 jours (Lauritzen et al., 2011). Des expériences *in vivo* chez l'animal ont montré la survenue de DCE quelques minutes après l'induction du TC (Fangyi et al., 2002; Von Baumgarten et al., 2008). Les DCE se propagent dans la substance grise et semblent être arrêtées par les fibres de la substance blanche (Figure 17.A-B). Dans des conditions pathologiques, ces ondes apparaissent spontanément et le temps de repolarisation du tissu est prolongé par rapport aux expériences menées sur des cerveaux sains chez l'animal. Les évènements conduisant à l'initiation des DCE ne sont pas encore clairement compris. L'une des hypothèses est l'inadéquation de la balance énergétique. Dans le tissu ischémié, des dépolarisations péri-infarctus envahissantes peuvent apparaître lors d'une inadéquation entre l'offre et la demande d'énergie (oxygène) dans les zones dites « chaudes » (zone métastable en limite de l'hypoperfusion, maintenant leur potentiel membranaire à l'état d'équilibre). Les facteurs modulant l'offre et la demande de l'oxygène créent une ondulation spatiotemporelle dynamique qui va induire une diminution de la pression partielle en oxygène. Dans ces zones « chaudes », cette fluctuation va engendrer une dépolarisation. Cet effet semble avoir lieu lors d'une stimulation somatosensorielle de la zone pré-infarctus (von Bornstädt et al., 2015). Une deuxième hypothèse se porte sur l'excitotoxicité. Des niveaux extracellulaires accrus de K^+ et d'acides animés excitateurs dont le glutamate sont proposés comme des déclencheurs potentiels. Cette vague

dépolarise les neurones et libère le glutamate présynaptique, amenant à une activation des récepteurs NMDA et à une libération de K^+ dans le milieu extracellulaire. Cette libération de glutamate, et donc cette excitabilité, se propage aux régions voisines. En contrepartie, les niveaux de Ca^{2+} , Cl^- et Na^+ extracellulaires diminuent considérablement (afflux dans les neurones), ainsi que le pH (Figure 17.C). De plus, le volume extracellulaire se rétrécit en raison de l'absorption d'eau par les neurones pour rétablir l'homéostasie. Ce phénomène conduit au gonflement des neurones et des astrocytes, connu sous le nom d'œdème cytotoxique (Hartings et al., 2016; Stocker, 2019; Yağmur et al., 2019).

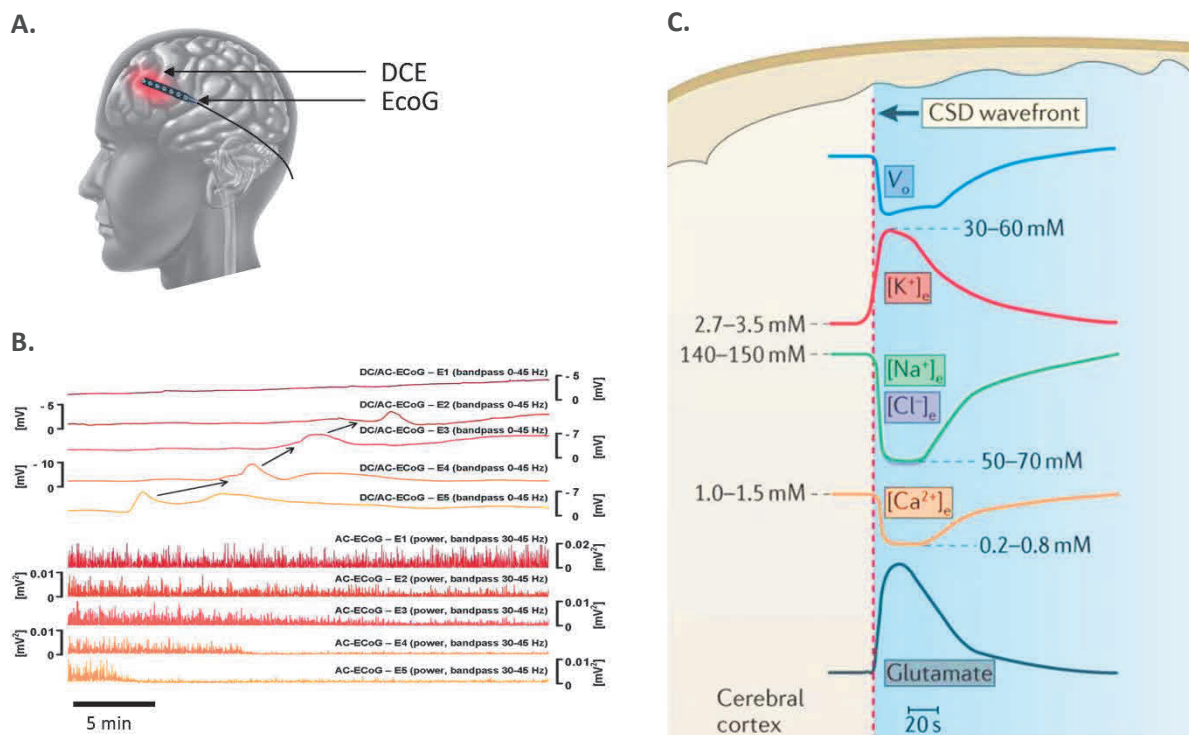


Figure 17. Caractérisation électrophysiologique de la dépolarisation corticale envahissante et des modifications ioniques associées. **A.** Représentation de l'emplacement de la bande d'enregistrement d'électrocorticographie (EcoG). **B.** Propagation d'une dépolarisation corticale envahissante (DCE) tout du long de l'EcoG passant d'une électrode à une autre. Les cinq tracés du haut montrent le changement de potentiel lent de la dépolarisation (DC/AC EcoG exprimé en mV) et les cinq du bas pour la dépression de l'activité électrique cérébrale lors du passage de la DCE (AC-EcoG, en mV). Chaque couleur correspond à une électrode (total de cinq électrodes). **C.** Lors d'une DCE, les concentrations extracellulaires en K^+ et en glutamate augmente, et celles en Ca^{2+} , Cl^- et Na^+ diminuent. Illustration modifiée à partir de (Drenckhahn et al., 2012; Pietrobon & Moskowitz, 2014).

La DCE est donc une vague de dépolarisation corticale qui se propage lentement. Cette dépolarisation constitue la première phase du phénomène (durée d'une minute) puis est suivie d'une période de silence électrique de l'activité des neurones corticaux (dépression) de plusieurs minutes. Cette dépolarisation est telle que la génération de potentiels d'action devient impossible. Ce mécanisme impose une charge bioénergétique importante aux cellules. En effet, une régulation à la hausse des voies glycolytiques conduit à une diminution du glucose lors des DCE qui semble délétère pour le tissu lésé en demande d'utilisation du glucose pour retourner à des valeurs basales. De plus, une accumulation de lactate se produit lors des DCE (Balança et al., 2017). La restauration de l'activité neuronale nécessite une forte demande métabolique et une augmentation transitoire du débit sanguin cérébral qui se propage dans le cortex en même temps que les DCE (Yağmur et al., 2019). Dans certains cas pathologiques, les DCE imposent une hypoperfusion prolongée due à une constriction artériolaire sévère. Les DCE peuvent donc être liées à une hypoperfusion des tissus cérébraux et à une expansion de la pénombre ischémique élargissant la zone d'infarctus (Dreier, 2011; Stocker, 2019).

II.3. Prise en charge hospitalière

Le TC produit diverses lésions qui s'aggravent dans le temps. La prise en charge hospitalière des patients traumatisés sévères est donc cruciale pour la récupération post-TC et pour leur pronostic vital. Les patients traumatisés sévères nécessitent un traitement dans une unité de soins intensifs en étroite collaboration avec une équipe multidisciplinaire et équipée de matériels adaptés, ainsi que d'un personnel formé aux protocoles appropriés (Varelas et al., 2006). Les principaux objectifs sont la prévention des agressions cérébrales secondaires et l'optimisation des conditions de la récupération et de la rééducation précoce des patients (Stocker, 2019).

À leur arrivée, l'état neurologique des patients cérébrolésés est évalué sur la base de **l'échelle de Glasgow** et de **la réactivité pupillaire**. La pupillométrie automatisée est une technique portative qui mesure la taille de la pupille et de sa réactivité à la lumière. Une pupille dilatée non rétractive résulte souvent de la compression du nerf oculomoteur pouvant être induit par une hernie cérébrale (Larson & Behrends, 2015). Un premier examen par CT-scan est en général réalisé à l'admission et un deuxième est effectué dans les 24 h chez les patients comateux. Cela permet d'établir un diagnostic et de programmer, le cas échéant, une intervention chirurgicale (Stocker, 2019).

L'hypotension artérielle est surveillée durant les premières heures. En effet, elle augmente le risque de mortalité et d'ischémie cérébrale, aggravant ainsi le pronostic neurologique. L'une des causes est l'hypovolémie. L'hypotension peut être mesurée de manière invasive ou non, et le

traitement consiste en l'administration de composés vasoconstricteurs tels que la vasopressine (hormone antidiurétique) ou de type phényléphrine et/ou noradrénaline pour leurs actions sur le retour veineux et les effets inotropes positifs. Chez les patients hypotendus, la présence d'une hypovolémie résultant d'une hémorragie extracrânienne doit être connue. Il est possible qu'une hypovolémie se développe par fuite trans-capillaire. En cas de perturbation de la BHE, l'utilisation d'une solution hypotonique peut entraîner une augmentation de l'œdème. Afin de remédier aux altérations de la volémie, il est suggéré de perfuser un certain volume de liquide comme une solution saline (solution de cristalloïde équilibré ou du lactate Ringer). Cependant, un grand volume peut entraîner une acidose métabolique hyperchlorémique pouvant être préjudiciable pour le patient (Dash & Chavali, 2018).

La pression intracrânienne est un point de surveillance important qui entre en jeu dans la survie des patients. Différentes techniques peuvent être utilisées pour la mesurer comme le cathéter intraventriculaire qui a également un rôle de drainage thérapeutique du liquide céphalorachidien. L'inconvénient est le risque d'infection malgré l'utilisation d'antibiotiques. Le traitement d'une PIC trop élevée (> 20 mm Hg) peut se faire par l'élévation de la tête pour éviter la congestion veineuse. Mais aussi, elle peut être diminuée par la ventilation mécanique, le maintien de la température corporelle (l'hypothermie étant indiquée pour diminuer le volume et le débit sanguin cérébral), l'analgésie et la sédation, le drainage ventriculaire, l'utilisation de molécules diurétiques (20 % de mannitol ou du sérum hypertonique) ou d'autres médicaments comme les barbituriques (Ku, 2019; Stocker, 2019). Une craniotomie décompressive peut aussi être réalisée (Qiu et al., 2009). Le doppler transcrânien est une technique non invasive de la surveillance du flux des globules rouges dans les gros vaisseaux sanguins (hémodynamisme). Cette technique est utilisée pour diagnostiquer le vasospasme, les élévations de la PIC et la diminution de la pression de perfusion cérébrale (Ku, 2019).

L'oxygénation des tissus cérébraux doit rester stable et donc être surveillée chez les patients traumatisés. Elle dépend de la teneur du sang artériel en oxygène, du DSC et de l'activité métabolique du tissu. Pour surveiller l'oxygène dissout dans le tissu, des sondes intracrâniennes peuvent être utilisées (surveillance de la PtiO₂ ou moniteur de la PIC). Toutefois, l'emplacement de la sonde doit être pris en considération. En effet, son implantation dans une zone lésée révèle le développement d'une lésion secondaire, tandis que les valeurs peuvent apparaître normales en dehors des zones ischémisées (Martini et al., 2013). La mesure de PtiO₂ (pression tissulaire cérébrale en oxygène) peut être utilisée pour détecter l'hypoxie cérébrale associée à un pronostic défavorable après un TC (Bouzat et al., 2013). La saturation veineuse jugulaire en oxygène est une autre méthode invasive pouvant guider la thérapie du patient. La technique d'oxymétrie cérébrale (*Near-infrared spectroscopy*, NIRS)

est non invasive (placée au niveau du cuir chevelu) et permet de suivre en continu la saturation en oxygène. Elle peut également être utilisée pour des applications de diagnostic (surveillance de l'oxygénation et de l'autorégulation). Son principe se base sur les propriétés d'absorption différentielle de l'hémoglobine et du cytochrome oxydase dans les longueurs d'ondes proche de l'infrarouge (700 et 1 000 nm), qui détermine le degré d'oxygénation des tissus.

La détresse respiratoire est récurrente dans les cas de TC sévère. Il existe des troubles de la déglutition liée au coma avec un risque d'inhalation de liquide gastrique ou de sang. Une obstruction des voies supérieures aériennes est également fréquente causée par un trouble du tonus lié au coma ou au TC facial. Une intubation orotrachéale et **une ventilation mécanique** sont donc préconisées. De plus, cela permet un contrôle de l'échange gazeux au niveau alvéolaire et un maintien de la PaO₂ et de la PaCO₂ à des valeurs adéquates.

La sédation et l'analgésie sont assurées par des traitements médicamenteux afin de lutter contre la douleur et l'inconfort liés à la ventilation mécanique. Elles permettent également de diminuer la consommation tissulaire en oxygène et de prévenir des désordres neurologiques tels que les premières crises d'épilepsie qui peuvent être accompagnées de convulsions (Flower & Hellings, 2012).

La température doit être maintenue à une valeur physiologique et l'hyperthermie doit être évitée. Le maintien d'une hypothermie (33°C) est une stratégie neuroprotectrice qui limite l'excitotoxicité, l'inflammation et prévient des carences en ATP, tout en diminuant la production de radicaux libres et la surcharge calcique intracellulaire (Andresen et al., 2015). La température est ajustée grâce aux effets antipyrétiques du paracétamol ou par refroidissement externe du patient (couverture, glace).

La glycémie est contrôlée fréquemment car une hypo- ou une hyper-glycémie est néfaste pour le patient et augmente le taux de mortalité (Matsushima et al., 2012). Nous avons vu qu'un contrôle strict de la glycémie est également néfaste. Le contrôle du glucose et du lactate est fait par une prise de sang, mais aussi localement par la microdialyse cérébrale avec notamment les rapports lactate/glucose et lactate/pyruvate (marqueur d'ischémie) qui doivent rester dans des gammes physiologiques.

La prévention de l'épilepsie post-traumatique n'est pas systématiquement mise en place. Ces épisodes sont observables par l'électrophysiologie (électroencéphalographie, EEG). La détection des crises épileptiques doit être précoces et les éventuelles crises traitées rapidement. La prévention peut être envisagée en cas de facteurs de risque par différents traitements tels que la phénytoïne ou le

lévétiracétam (respectivement modulateur des canaux sodiques et calciques, et inhibiteur de canaux calciques).

II.4. Résumé

Le traumatisme crânien sévère induit une multitude de lésions cérébrales qui évoluent dans le temps de façon dynamique et peuvent s'aggraver si aucune prise en charge du patient n'est menée (Figure 17). Des lésions primaires telles que les fractures de l'os, les lacérations et contusions, la rupture de la BHE aboutissent à des hémorragies et les lésions diffuses (axonales et hémorragies pétéchiiales) qui apparaissent au cours des premières secondes après le traumatisme sont inévitables. Puis, des lésions cérébrales secondaires hétérogènes et multifactorielles s'installent dont les origines sont soit systémiques, soit locales. Elles peuvent s'observer au niveau tissulaire (hypertension intracrânienne, ischémie, vasospasme, hydrocéphalie post-traumatique et œdèmes) ou cellulaire (excitotoxicité, stress oxydant, inflammation, mort cellulaire). De plus, des dysrégulations de l'activité cérébrale peuvent survenir lors du TC sévère comme les crises épileptiques ou les dépolarisations corticales envahissantes. Ce panel de lésions secondaires se développe continuellement dans les heures suivant le TC, jusqu'à plusieurs années. Ces diverses altérations peuvent s'amplifier, les unes aux autres, dans un cercle vicieux qui contribue au mauvais pronostic pour le patient.

Dans le chapitre suivant, nous aborderons les séquelles comportementales et les symptômes survenant à la suite d'un TC, en particulier sévère.

III. Séquelles et symptômes post-traumatiques

Le TC est un processus pathologique chronique entraînant des séquelles visibles (sensorielles, motrices) ou invisibles (cognitives, émotionnelles), et prédisposant à certaines pathologies neurologiques, mais également à des désordres non-neurologiques. Ces complications se manifestent tout au long de la vie du patient et dépendent de plusieurs paramètres. Ils comprennent le degré de gravité du TC, le mécanisme et la localisation cérébrale des lésions, mais aussi les prédispositions des patients avant le TC, les stratégies de rééducation et de compensation mises en place par le patient, ainsi que les supports matériels et sociaux. La prévention de ces séquelles nécessite une prise en charge individuelle des patients traumatisés du fait de cette diversité symptomatique. Ces séquelles limitent la réintégration sociale tant professionnelle que personnelle des patients. De plus, le handicap accentue l'impact sur la société par le coût de prise en charge et de rééducation ainsi que par la perte d'activité professionnelle. La grande majorité des patients présentant des séquelles de long terme ont subi un TC sévère.

III.1. Histoire et anatomie

III.1.1. Cas de Phineas Gage

L'histoire de Phineas Gage (1823 - 1860) est un exemple intéressant de TC sévère et de la temporalité des expressions lésionnelles. Il était contremaître des chemins de fer, et alors qu'il préparait de la poudre pour faire exploser un rocher, le bourroir (barre de mine, 6 kg, 109 cm de long et 3,18 cm de diamètre) est venu heurter le rocher, déclenchant une explosion. Le bourroir a perforé son crâne. Mais malgré cet accident spectaculaire, P. Gage a survécu. Il présentait une forte hémorragie, des dommages au lobe frontal gauche et plusieurs morceaux d'os ont été retirés (Harlow, 1999). Malgré la perte de son œil gauche, P. Gage s'était remis en quelques mois de l'accident sans présenter de paralysie. Toutefois, le docteur John Harlow, qui l'avait pris en charge, constata des modifications dans son caractère, aux niveaux émotionnel, social (ex. instabilité professionnelle) et personnel. Douze ans plus tard, il a été sujet à des crises épileptiques et mourut suite à une crise particulièrement violente (Sevmez et al., 2020). À partir de son crâne conservé et par l'intermédiaire de la neuroimagerie, son cerveau a été reconstitué pour observer les régions lésées (**Figure 18**). Van Horn *et al.* (2012) définissent une perte de 11 % du volume de la substance blanche et de 4 % de la substance grise avec une connectivité altérée entre les lobes frontaux et les noyaux gris centraux, l'insula, le système limbique du côté gauche, accompagnés de dommages moindres du côté droit. Ces

lésions étaient probablement un facteur important dans la symptomatologie post-lésionnelle et les problèmes comportementaux relatés.

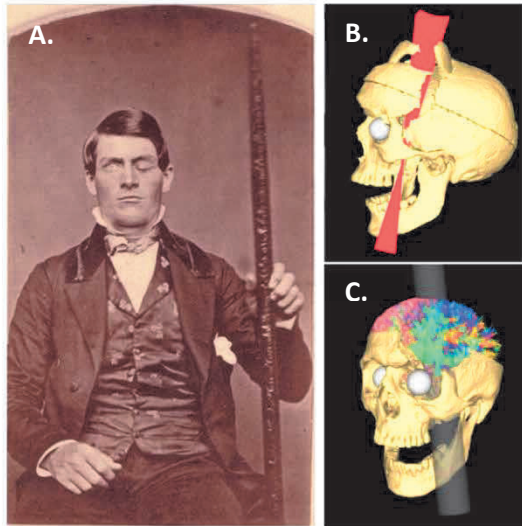


Figure 18. Le cas de Phineas Gage (1823 - 1860) ayant eu un traumatisme crânien pénétrant. **A.** Photographie de P. Gage tenant le bourroir qui a perforé sa boîte crânienne. **B.** Reconstruction d'images d'IRM présentant la trajectoire la plus proche qu'a suivi le bourroir. **C.** Représentation des fibres et de leur destruction suite à la pénétration du bourroir. D'après (Teles, 2020; Van Horn et al., 2012).

III.1.2. Généralités

Dans cette section, nous aborderons les généralités globales sur l'encéphale, les différentes zones, leur spécificité et les conséquences suite à des lésions (Figure 19). Ces notions permettent de s'interroger sur les compartiments cérébraux atteints à la suite d'un TC et les complications exprimées.

Le tronc cérébral est constitué des pédoncules cérébelleux, du pont (protubérance) et du bulbe (la moelle allongée). Dix paires de nerfs crâniens (sensitive, motrice ou mixte) émergent du tronc cérébral. Cette structure est également le lieu de passage obligatoire des informations sensorielles afférentes et des actions motrices efférentes de la périphérie. Il joue un rôle important dans le contrôle et la régulation des fonctions vitales telles que la respiration, le rythme cardiaque, la pression artérielle, la température corporelle, la déglutition, la digestion et l'état de vigilance. Les lésions du tronc cérébral occasionnent de graves conséquences comme le coma (états végétatif, minimal conscient, confusionnel) ou le syndrome de verrouillage (paralysie motrice avec privation de la parole).

Le cervelet est impliqué dans des fonctions bien précises comme l'équilibre, la posture, le tonus musculaire, la coordination/le contrôle des mouvements volontaires ou encore des réflexes fins. Des séquelles au cervelet peuvent donc engendrer des troubles de la coordination et de la synchronisation des contractions musculaires nécessaires au mouvement, l'incapacité à juger du moment approprié pour amorcer le mouvement et l'arrêter, ou encore l'apprentissage de nouvelles habiletés.

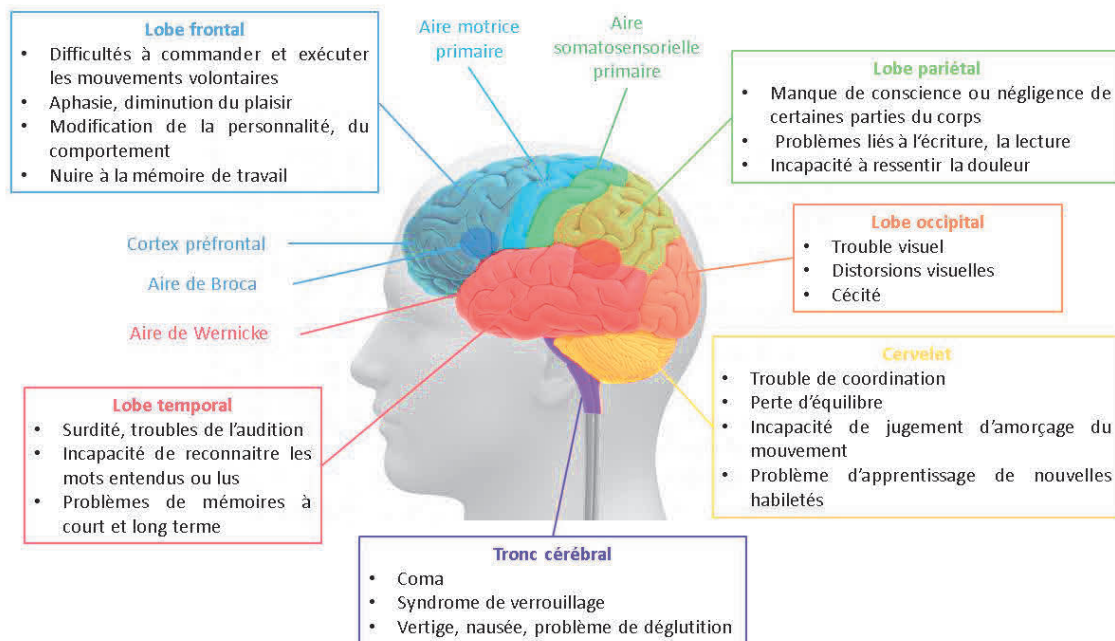


Figure 19. Séquelles retrouvées après un traumatisme crânien suivant les structures cérébrales endommagées. Cette illustration représente les différentes régions cérébrales et les déficits pouvant en résulter si elles sont lésées. D'après (Marie-Robert, 2014).

Le **cerveau** est constitué de deux hémisphères (droit et gauche) ayant des fonctions complémentaires, et dont chacun est composé de quatre lobes :

Le lobe frontal subit souvent des dommages lors d'un TC sévère, notamment au niveau du cortex préfrontal. Cette région est considérée comme le siège de la cognition supérieure, impliquée dans des fonctions exécutives telles que le contrôle et la régulation de la cognition, des comportements et des émotions, la planification et le raisonnement déductifs, les processus d'affections et motivationnels, l'autorégulation des comportements, ainsi que le traitement des conflits et de la récompense. Le cortex moteur, quant à lui, participe à la planification, au contrôle et à l'exécution des mouvements volontaires des muscles, et à la coordination de certains mouvements. L'aire de Broca permet de verbaliser les pensées. Toutefois, son atteinte génère une aphasie et une incapacité à articuler les mots. Ainsi, les dommages de ce lobe conduisent à des changements de la personnalité, à des difficultés pour contrôler ses pulsions, pour commander des mouvements et pour les exécuter. De plus, cela peut détériorer la mémoire de travail (maintien temporaire et manipulation des informations comme la réalisation d'une tâche précise).

Le lobe temporal a aussi un rôle dans de multiples processus cognitifs. Il est impliqué dans l'audition, la reconnaissance des sons, des voix, des musiques (l'aire de Wernicke contrôle le langage avec le lobe frontal). Il intervient aussi pour contrôler la peur et l'agressivité. Le lobe temporal engage la mémoire à court et à long terme. Les régions lésées vont donc induire des troubles de la mémoire notamment des mots et de la parole, des problèmes d'audition avec une incapacité à reconnaître les mots entendus ou lus.

Le lobe pariétal a principalement un rôle associatif notamment sensoriel (toucher, vision, audition), dans l'assimilation de l'information des sens et la perception de la douleur. Il est également impliqué dans l'interprétation du langage et des mots, et joue un rôle dans la conscience du corps et de l'espace environnant. Une atteinte de ce lobe peut induire une perte dans la distinction de la droite et de la gauche, un manque de conscience ou de négligence de certaines parties du corps et des sens provoquant des difficultés à atteindre et à manipuler des objets, des problèmes liés à l'écriture et la lecture. Cela peut également engendrer une incapacité à ressentir la douleur ou la chaleur.

Le lobe occipital est le centre d'intégration des messages visuels dans la reconnaissance, l'analyse, l'attention visuelle des visages, des objets, de soi et des lieux connus. Une atteinte peut conduire à un trouble ou une perte du champ de vision, à des distorsions visuelles et à une cécité pouvant s'accompagner d'une perte de mémoire des lieux connus.

Le cortex insulaire, situé au fond du sillon latéral, constitue le cinquième lobe cérébral. Il est associé au système limbique composé des structures sous-corticales : l'hippocampe impliqué dans la mémoire à long terme, l'amygdale, le fornix, l'hypothalamus et les ganglions de la base. La substance blanche, considérée comme l'autoroute de la communication, est formée par les axones regroupés en faisceaux. Elle intervient dans la communication entre les hémisphères (corps calleux, faisceaux commissuraux), entre les régions d'un même hémisphère (faisceaux d'association), entre le cortex cérébral et les structures sous-corticales médullaires (faisceaux de projection), et entre les fonctions centrales et périphériques (décussation pyramidale, **Figure 20**).

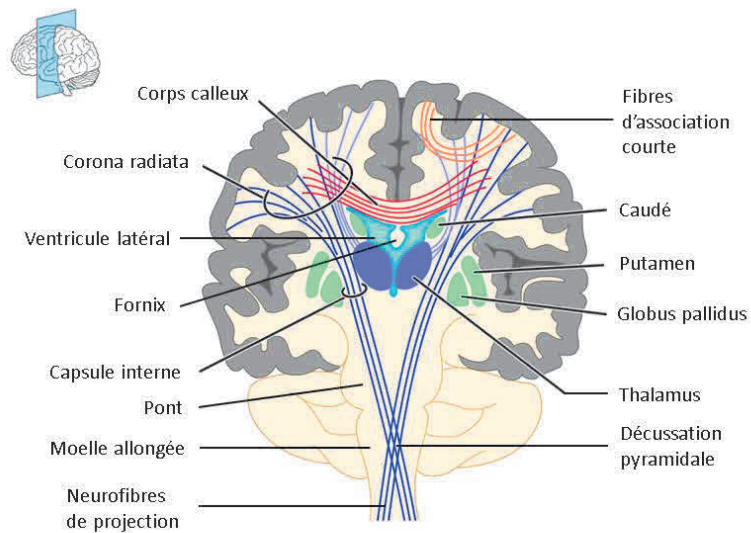


Figure 20. Représentation de certaines fibres de la substance blanche et de structures sous-corticales. Les lignes de couleurs correspondent aux différents faisceaux de la substance blanche connectant différentes structures. Coupe coronale. D'après (Moeller et al., 2015).

Ces différentes structures sont endommagées lors d'un TC sévère, impliquant de lourdes séquelles pour les patients traumatisés modérés-sévères survivants. Les sites fréquents des dommages cérébraux causés par un TC de contact ou d'inertie sont les pôles temporaux antérieurs, les cortex temporaux latéraux et inférieurs, les lobes frontaux et les cortex frontaux orbitaux. De plus, la substance blanche n'est pas épargnée avec des lésions étendues et diffuses dont les zones de vulnérabilité comprennent le corps calleux, le tronc cérébral rostral et la substance blanche sous-frontale. Les neurotransmetteurs jouent un rôle important dans le maintien des homéostasies cognitive et comportementale qui se trouvent modifiées lors du TC (Kim et al., 2019; McAllister, 2008).

III.2. Dysfonctionnements sensoriels

Les déficits sensoriels après un TC sont les séquelles les moins étudiées qui sont pourtant la cause d'invalidité et de difficultés de rééducation.

III.2.1. L'olfaction

L'olfaction n'est pas automatiquement évaluée après un TC mais l'anosmie post-traumatique, c'est-à-dire la perte de l'odorat, et l'hyposmie sont des séquelles couramment documentées. Ces deux symptômes sont englobés dans le terme général de troubles olfactifs post-traumatiques. L'altération de ce sens n'est pas autant visible que les autres, et peut être considéré comme un désagrément plutôt qu'un handicap malgré la mise en danger des patients dans leur vie quotidienne (Fortin et al., 2010; Pence et al., 2014). Chez les patients sous sédation prolongée, intubés ou présentant des troubles

cognitifs, ces déficits olfactifs sont souvent ignorés. Ces troubles chimiosensoriels sont détectables à postériori plusieurs jours ou semaines après le traumatisme. Trois mécanismes sont impliqués dans l'anosmie : (1) la perturbation du tractus naso-sinusien, (2) le cisaillement direct ou l'étirement des fibres nerveuses olfactives, particulièrement au cours de traumatismes d'accélération-décélération, et (3) l'atteinte des centres corticaux et du bulbe olfactif par exemple lors d'une contusion ou d'une hémorragie focale. Le degré de sévérité du TC et le temps d'amnésie post-traumatique semblent être corrélés avec la perturbation de l'olfaction. Ainsi, 0 à 16 % des patients avec un TC léger présentent une anosmie post-traumatique, contre 11 à 15 % pour les TC modérés et 25 à 30 % pour les TC sévères (Howell et al., 2018).

III.2.2. Le goût

Contrairement à l'olfaction, peu d'études existent sur l'altération du goût après une lésion cérébrale acquise car ces déficits ont moins retenu l'attention clinique et scientifique, et la modification de ce sens est plus subtile. Il peut passer inaperçu (Reiter et al., 2004). Ces troubles du goût post-traumatique sont souvent associés à ceux de l'odorat, dont le patient percevra davantage les changements. Les dysfonctionnements gustatifs intègrent par exemple l'agueusie, (absence de goût). Le TC peut léser directement la cavité buccale (langue, os mandibulaire, nerfs lingual et trijumeau, etc.), les fibres parasymphatiques pré-ganglionnaires agissant sur la salivation, l'os temporal amenant à un dysfonctionnement des nerfs du faciès, ou de façon indirecte, les structures cérébrales comme l'hypophyse induisant une altération hormonale (Reiter & Costanzo, 2012; Schofield & Doty, 2019).

III.2.3. L'audition

Les perturbations auditives des patients TC sont également peu étudiées dans la littérature scientifique et dans l'évaluation clinique. Pourtant, la détection et la prise en charge précoce des troubles auditifs permettent une amélioration cognitive et une meilleure réinsertion sociale. Deux principaux mécanismes peuvent produire des déficits auditifs : des lésions des zones cérébrales de l'audition ou des organes auditifs. Les traumatismes liés à une explosion, dans le cas des militaires, peuvent provoquer des acouphènes et une perte d'audition. Les lésions axonales diffuses touchent de nombreuses zones cérébrales dont celle fronto-temporale, la capsule interne, le tronc cérébral supérieur et le corps calleux qui sont directement impliqués dans le codage de l'information auditive. Les contusions aux niveaux des lobes fronto-temporaux comme les hématomes sous-duraux fronto-pariétaux, peuvent également être impliqués dans ces déficits (Knoll et al., 2020; Lew et al., 2007; Oleksiak et al., 2012). Dans certains cas, l'oreille interne peut être touchée entraînant des pertes d'équilibre et des vertiges.

III.2.4. La vue

Le TC peut engendrer une incapacité visuelle par un dysfonctionnement oculomoteur ou par l'atteinte de l'acuité visuelle et/ou du champ de vision. Ce déficit peut être dû à des dommages post-TC du globe oculaire, de l'orbite, du centre visuel (lobe occipital) ou des aires associées, mais aussi directement au niveau des nerfs (optique, oculomoteur, trochléaire et abducens). Les séquelles visuelles sont surtout étudiées et retrouvées chez les patients polytraumatisés notamment le personnel militaire (Cockerham et al., 2009). L'atteinte de ce sens après un TC modéré-sévère conduit à un déficit de la mémoire visuelle ainsi qu'à l'initiation spontanée des stratégies mnémotechniques (Deitcher et al., 2020). Ceci peut induire des difficultés dans la rééducation après TC.

III.2.5. Le toucher – la douleur

Dans la littérature, le toucher est principalement consacré à la perception de la douleur. Seo *et al.* (2013) rapportent qu'une patiente traumatisée et présentant une lésion thalamique gauche avait une sensation de picotement persistant et une douleur aux membres droits trois semaines après l'accident. La douleur aiguë est fréquente chez les patients traumatisés. Elle est associée à des lésions tissulaires et dure généralement quelques semaines en s'atténuant avec la guérison. Au contraire, la douleur chronique dure entre trois à six mois ou jusqu'à quatre à cinq ans suivant les études menées. Ses origines sont mal connues. Les patients cérébrolésés peuvent présenter une douleur chronique (51,5 % des patients civils et 43,1 % pour les vétérans). Une plainte de douleur chronique est retrouvée chez 32,1 % des TC modérés-sévères contre 75,3 % pour les TC légers. Dans le cadre du TC sévère, cette évaluation pourrait être sous-estimée par la présence de niveaux de conscience altérées, de troubles cognitifs ou de difficultés à s'exprimer. Différents mécanismes sont susceptibles de contribuer à la douleur chronique : un dysfonctionnement des systèmes inhibiteurs descendants nociceptifs (noyaux thalamiques, tractus spinothalamique et les différents lobes cérébraux), la neuroinflammation, la neurodégénérescence et les changements synaptiques et biochimiques (Bouferguène et al., 2019; Irvine & Clark, 2018). Les déficits sensitifs incluent également une diminution de la sensibilité comme l'anesthésie ou l'hypoesthésie.

III.3. Dysfonctionnement moteur

Une grande majorité des patients ayant un TC sévère présente un handicap physique persistant dans le temps. Ces handicaps et le temps de récupération dépendent de la localisation des dommages cérébraux, notamment aux niveaux des aires corticales, de nerfs cérébraux et

périphériques. Ces déficits sont liés aux lésions primaires et/ou secondaires du TC pouvant entraîner des périodes d'immobilisation prolongées pendant la phase de récupération (ex. patient comateux).

L'ossification hétérotopique (ou la formation osseuse périarticulaire anormale) est une transformation rapide du tissu musculaire qui se mue en structure osseuse calcifiée. Elle se produit chez 11 à 77 % des patients traumatisés. Les facteurs de risque incluent le coma prolongé (supérieur à deux mois), l'assistance ventilatoire, la spasticité et les fractures (Burnett et al., 2003). Il en découle une diminution de l'amplitude des mouvements, une ankylose articulaire, une douleur et une compression nerveuse qui sont associées à une mauvaise récupération fonctionnelle.

La spasticité désigne un syndrome de suractivité motrice provenant d'une atteinte des motoneurons supérieurs. Il en résulte une hypertonicité mais aussi une faiblesse et une perte de dextérité qui affectent la fluidité motrice (McNamee et al., 2009). Hillier *et al.* (1997) ont trouvé un déficit d'équilibre chez 34 % des survivants, une hémiparésie pour 15 % des cas et une quadraparésie pour 6 % des cas, cinq ans après le TC. Dans une autre étude, 29 % des patients traumatisés sévères présentaient une anomalie neuromotrice deux ans après le TC (test de la démarche en tandem) (Walker & Pickett, 2007).

Des dommages de la motricité fine, de la vitesse d'exécution, de la coordination et de la dextérité sont retrouvés 8 à 16 mois après un TC. De plus, les vertiges post-traumatiques touchent 20 à 65 % des patients traumatisés et persistent sur plusieurs mois en étant parfois invalidants (McNamee et al., 2009). La fatigue est le sentiment subjectif, et non spécifique, d'une capacité diminuée pour une activité physique et/ou cognitive et dont ses origines sont multifactorielles. Elle est également une plainte fréquente pour 43 à 73 % des patients traumatisés, quelle que soit la gravité du TC. La fatigue peut persister jusqu'à 10 ans (Ashman et al., 2006; Belmont et al., 2006; McNamee et al., 2009).

Ainsi, le rétablissement de la locomotion peut prendre plusieurs mois en fonction de la gravité des blessures physiques et des lésions neurologiques, avec des troubles pouvant persister dans le temps. Ces troubles moteurs peuvent limiter les activités de la vie quotidienne et la réinsertion socioprofessionnelle des patients. Cependant, ces troubles moteurs sont plus facilement objectivables par les patients que les déficits cognitifs.

III.4. Dysfonctionnements cognitifs

Les dysfonctionnements cognitifs sont les séquelles post-traumatiques les plus étudiées. Soixante-cinq à 76 % des TC sévères rapportent un problème sur du long terme, 1 an après, contre 15 à 50 % des TC légers-modérés (Rabinowitz & Levin, 2014; Thornhill et al., 2000). Les TC sévères provoquent une perte initiale majeure de la conscience et, selon la localisation des lésions neurologiques, les patients se retrouvent en état végétatif persistant (aucune conscience de soi, ni interaction avec l'environnement) ou dans un état de conscience minimale (interaction minimale avec l'environnement comme le contact visuel, l'agrippement ou une réponse verbale basique). Les déficits de mémoire, d'attention ainsi que les troubles des fonctions exécutives sont les plus fréquemment rapportés après un TC, et sont liés aux lésions primaires ou secondaires, mais aussi aux complications survenant par la suite comme les troubles du sommeil (Ahmed et al., 2017). Lors d'un TC sévère, la cognition semble être altérée environ un mois après la lésion ou peu de temps après la récupération de l'amnésie post-traumatique. La récupération cognitive ne revient pas après deux ans suite au TC sévère tandis que ces troubles disparaissent entre trois à six mois chez 80-85 % des TC légers (Barman et al., 2016; Rabinowitz & Levin, 2014).

Les déficits de l'attention peuvent inclure des difficultés d'attention, de concentration soutenue, un temps de réaction retardé, une distraction, une vitesse de traitement réduite et une altération du multitâche (ex. marcher et parler) (Halbauer et al., 2009; Tsaousides & Gordon, 2009). La mémoire est l'une des fonctions cognitives les plus altérées par le TC et semble se récupérer en moins de trois mois chez les TC légers, contre des troubles à long terme et persistants chez les TC modérés-sévères (Obenaus, 2016).

La mémoire à court terme (conservation et récupération d'information limitée dans une courte période) est altérée après un TC dont la durée dépend de sa gravité. En effet, un TC léger peut amener à un dysfonctionnement de la mémoire jusqu'à trois mois après l'accident, contrairement au TC modéré-sévère dont les déficits peuvent persister plus longtemps ou être permanents (Obenaus, 2016). Les patients oublient les nouvelles informations ou ont des difficultés à les organiser, suggérant des lacunes dans la capacité à stocker et à consolider les nouvelles informations (Rabinowitz & Levin, 2014). Les patients traumatisés ont aussi des difficultés à traiter les connaissances sémantiques (faits, concepts et significations). Ainsi, la récupération de la mémoire déclarative est plus longue (Obenaus, 2016). Les déficits de la mémoire de travail et de la planification peuvent être associés à des lésions du cortex préfrontal dorsolatéral ou des lésions axonales diffuses dans les régions frontales (Skidmore, 2015).

Les fonctions exécutives sont un ensemble de processus cognitif permettant une habilité mentale (adaptation aux situations nouvelles, planification, organisation, gestion, etc.). Elles impliquent donc une variété de capacités cognitives d'ordre élevé et principalement sous-tendues par les régions du cortex préfrontal et leurs circuits sous-jacents. Les déficits de ces fonctions exécutives ont des conséquences sur la qualité de vie notamment sur le rendement du travail, les relations sociales et les activités quotidiennes (apprentissage, mémoire, planification, prise de décision, jugement) (Rabinowitz & Levin, 2014). Les patients traumatisés sévères ont souvent une altération de la prise de décision, plus marquée que les TC légers, ainsi que des problèmes d'impulsivité, d'ajustement au risque et aux choix rationnels. Ces déficits sont reliés à des lésions observables par la neuroimagerie (imagerie par tenseur de diffusion). L'impulsivité est corrélée aux blessures dans le gyrus frontal orbitaire, l'insula et le noyau caudé. L'ajustement du niveau de risque est associé à des anomalies des structures sous-corticales (thalamus, striatum dorsal, noyau caudé), tandis que les problèmes de choix rationnel sont liés à des lésions focales du cortex préfrontal dorsolatéral, du gyrus frontal, du cortex préfrontal, du striatum ventral et de l'hippocampe (Newcombe et al., 2011). Les patients cérébrolésés sévères ont une prévalence à l'apathie de 46 à 71 % et donc ils présentent une diminution de leur activité quotidienne dirigée vers un objectif, ainsi qu'une motivation réduite, pouvant mener à un retrait social et à une diminution des activités de soins personnels du patient (Rabinowitz & Levin, 2014). Cette apathie a été associée à des lésions sous-corticales et un dysfonctionnement de l'hémisphère droit (Andersson et al., 1999).

La métacognition désigne la conscience générale des capacités cognitives de soi (anticiper lors de l'exécution d'une tâche, remarquer et corriger une erreur, prédire les performances futures). Après un TC, les compétences métacognitives peuvent être affectées (Rabinowitz & Levin, 2014). Par exemple, les patients ont une conscience réduite de leur déficit (auto-évaluation) ou une méconnaissance de leurs erreurs (prise de conscience et autocorrection) altérant les processus de réadaptation et de rééducation (Chiou et al., 2011; Sara, 2020).

La récupération cognitive après un TC modéré-sévère est souvent difficile la première année, mais une amélioration graduelle peut être observée les années suivantes en fonction de l'apprentissage et du développement de stratégies compensatoires. Cependant, au-delà de cinq ans après le TC, les déficits peuvent persister, en particulier dans les cas de TC graves (Rabinowitz & Levin, 2014).

III.5. Troubles psychologiques

Les troubles neuropsychologiques après TC sont variés et dépendent de l'âge du patient, de la gravité initiale du TC, du type de lésion, de la sociopathie, du soutien social dont bénéficie le patient, d'une éventuelle toxicomanie, ou de troubles neurologiques et/ou psychologiques antérieurs (Ahmed et al., 2017).

III.5.1. La dépression

La dépression est un trouble psychiatrique persistant causé par un dérèglement de l'humeur tel que le sentiment de déprime et de tristesse, elle est fréquemment observée après un TC sévère avec une prévalence de 25 à 50 % (Riggio, 2011). L'étude de Deb *et al.* (1999) signale qu'un an après un TC sévère, 13,9 % des patients avaient développé une dépression. Seel *et al.* (2003) ont décrit, des symptômes de fatigue, mais aussi de colère/d'irritabilité (28 % des TC), de distractibilité (28 %) et de rumination (25 %). L'effet et la responsabilité de l'humeur sont observés dans les cas de lésions limbiques temporales et du cerveau antérieur basal (Ahmed et al., 2017). Kant *et al.* (1998) ont constaté une dépression accompagnée d'apathie dans 60 % de leur cohorte traumatisée. Le sentiment de tristesse peut aussi être amplifié par le sentiment de regret de la vie précédant le TC. Le risque de suicide est augmenté après un TC. Il est la cause de 50 % des décès survenant pendant les six mois suivant le TC chez les patients survivants (Obenaus, 2016). Il est quatre fois plus fréquent après un TC sévère que dans la population générale, et dépend des environnements social, économique et géographique (Engberg & Teasdale, 2004).

III.5.2. L'anxiété

L'anxiété se définit comme une sensation de peur démesurée éprouvée à l'égard d'un environnement précis. Les patients traumatisés sont plus susceptibles de développer de l'anxiété ou des états de paniques (Ahmed et al., 2017). Le trouble de stress post-traumatique touche 18 à 27 % des patients cérébrolésés sévères (Bryant et al., 2000; Williams et al., 2002). Le développement de ce trouble est corrélé à la sévérité du TC et affecte les militaires, également les personnes dans les zones sans conflit (Van Praag et al., 2019).

III.5.3. L'agressivité

L'agressivité est surtout rapportée chez les patients atteints d'un TC sévère et représente jusqu'à 34 % des patients dans les six mois post-TC. Elle est alliée à une impulsivité susceptible d'impacter l'environnement social du patient. L'irritabilité (30 % des cas) ou la mauvaise humeur est fréquente en phase aiguë du TC (Ahmed et al., 2017; Kim et al., 1999; Rao et al., 2009). Ces troubles

de l'agressivité sont souvent corrélés à des lésions des lobes frontaux, et s'ajoutent souvent à des troubles affectifs et de la personnalité ainsi qu'à l'abus d'alcool ou de substances psychotropes (Riggio, 2011). Le comportement agressif est généralement déclenché suite à un stimulus et est toujours non planifié, non réfléchi. Il peut être exprimé par une violence physique ou verbale avec une attitude hostile (Ahmed et al., 2017).

III.5.4. La dépendance

La toxicomanie ou la dépendance est observée pour 13 % des cas de TC sur un suivi de 7,5 ans. Cependant, la plupart de ces patients présentaient une dépendance ou un abus avant l'accident traumatique ou un fort taux d'alcool dans le sang. Néanmoins, cela joue un rôle important dans le cas des décès prématurés, considéré comme une comorbidité. L'abus de substances psychotropes semble augmenter de 6 % la mortalité (Obenaus, 2016).

III.6. Troubles neurologiques

III.6.1. Troubles du sommeil

Les troubles du cycle veille-sommeil font également partie des séquelles fréquentes et persistantes après un TC. La prévalence de ces troubles varie en fonction du temps et de la gravité du TC. Les plaintes concernant la qualité du sommeil chez les TC sévères peut être en décalage avec la réalité (sur- ou sous-estimées) car les déficits cognitifs persistants peuvent altérer la perception de leur sommeil. Ces déficits du sommeil semblent plus importants pour les TC légers que pour les TC sévères (Duclos et al., 2014; Ouellet et al., 2006). Les troubles les plus souvent rapportés sont le changement du sommeil (42 à 80 % des TC sévères), une perte du maintien du sommeil (50 %), un réveil matinal (38 %), des difficultés d'endormissement (36 %) et des cauchemars (27 %). L'insomnie est présente chez 50 % des patients traumatisés sévères avec une persistance jusqu'à deux ans après le TC (Mathias & Alvaro, 2012). L'hypersomnie ou le besoin accru de sommeil, souvent associée à une somnolence diurne excessive, est présente (60 %) en majorité chez les TC sévères (Duclos et al., 2014; Masel et al., 2001). Ces perturbations peuvent être dues aux lésions cérébrales traumatiques (neurodégénérescence, diminution de la densité synaptique), à des niveaux altérés de mélatonine (trouble du cycle circadien), ou d'hypocrétine 1 (neuropeptide excitateur sécrété par l'hypothalamus impliqué dans l'hypersomnie) ou encore à un dysfonctionnement neuroendocrinien de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Duclos et al., 2014). Il faut également tenir compte des pathologies neurologiques et psychiatriques pouvant engendrer des troubles du sommeil comme la dépression, l'anxiété ou encore la douleur.

III.6.2. Troubles neuroendocriniens

Les TC sévères sont susceptibles de provoquer des lésions hypothalamo-hypophysaires impliquant des troubles du système neuroendocrinien (Masel & DeWitt, 2010). Ces lésions peuvent également être retrouvées dans le cadre de TC répétés. Ces dysfonctionnements peuvent résulter de lésions vasculaires ou de neuroinflammations au niveau des noyaux hypothalamiques, d'une section totale ou partielle de la tige hypophysaire avec ou sans nécrose, ainsi que des lésions de l'hypophyse qui peuvent être dues à une augmentation de la PIC ou d'un œdème dans cette région (Mele et al., 2021; Valdes et al., 2018). L'hypopituitarisme post-traumatique aigu ou chronique est retrouvé chez 30 % des patients souffrant d'un TC sévère au cours de la première année après le TC (Schneider et al., 2007). En chronique, ces troubles peuvent aboutir à des déficits de différentes hormones. L'hormone de croissance est diminuée dans 20 % des cas de TC sévère et les conséquences sont une fatigue accrue, une diminution de la tolérance à l'exercice, la dépression, l'ostéoporose ou l'hypercholestérolémie. L'impact sur les hormones gonadotropes représentant 10-15 % des cas conduit à une réduction de la libido, de la masse musculaire et de la force (Belmont et al., 2006; Masel & DeWitt, 2010). Une hypothyroïdie a été retrouvée dans 5 % des cas de TC sévère associée à une prise de poids, une dyspnée, de la bradycardie, une déficience intellectuelle ou une dépression (Masel & DeWitt, 2010). Les déficiences des hormones adrénocorticotropes et thyrotropes peuvent également survenir (Valdes et al., 2018).

III.6.3. Épilepsie post-traumatique

Comme expliqué dans la partie II de l'introduction, les patients traumatisés sont susceptibles de développer une épilepsie post-traumatique au stade précoce (les premiers jours) ou tardif (supérieur à une semaine) après le TC. Sur le long terme, les patients ayant subi un TC représentent 4 % des cas d'épilepsie (Gupta et al., 2014). Christensen *et al.* (2009) ont observé que le risque était plus élevé au cours des six premiers mois avec 5,46 % pour les TC légers et 21,26 % pour les TC sévères. Ce taux diminue dans la deuxième moitié de l'année suivant le TC avec 2,91 % et 13,45 % respectivement. En général, le risque de crise épileptique tardive diminue avec le temps, mais se retrouve en plus grande proportion chez les patients traumatisés sévères avec 4,29 % de cas contre 1,51 % chez les TC légers sur 10 ans (**Figure 21**). En majorité, les patients subissent leur première crise dans les deux ans après l'accident pour 7,42 à 17 % d'entre eux. Les TC modérés présentent un risque inférieur avec un taux de 2,9 à 7,6 % (Annegers et al., 1998; Christensen et al., 2009; Ferguson et al., 2010). Jusqu'à 86 % des survivants d'un TC avec une première crise post-traumatique en auront une seconde dans les deux ans. Outre les mécanismes moléculaires, les facteurs de risques pour les crises tardives sont l'âge à l'instant du TC, la gravité de la lésion, la présence d'une crise précoce suivant le TC ou l'ayant

précédée, un hématome sous-dural, une contusion cérébrale, l'alcoolisme chronique prémorbide, un TC pénétrant avec une fracture crânienne, et une perte tissulaire cérébrale avec un changement structural permanent (Ding et al., 2016). De plus, les lésions situées dans les lobes temporaux ou frontaux sont plus fréquemment associées à une crise post-traumatique (Fordington & Manford, 2020; Tubi et al., 2019).

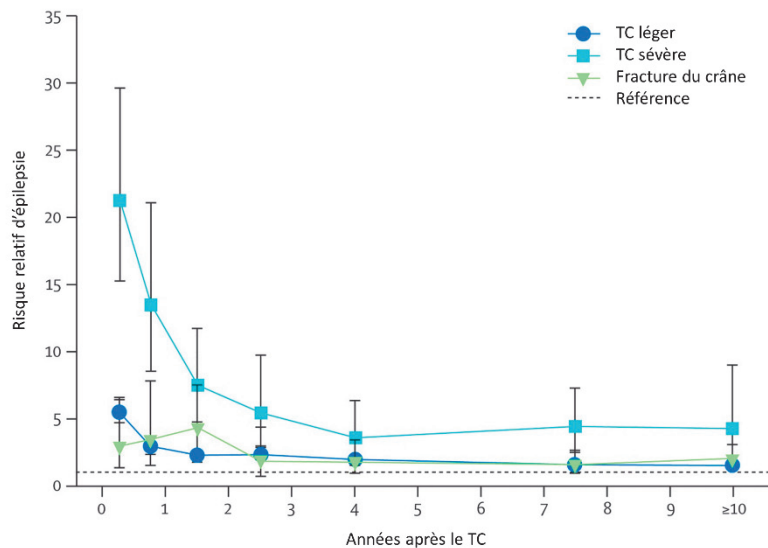


Figure 21. Risque relatif d'épilepsie après un traumatisme crânien. L'étude a été réalisée sur la population du Danemark entre 1977-2002. Le risque d'épilepsie après un traumatisme crânien (TC) est élevé sur les deux premières années puis diminue avec le temps. Le TC sévère présente un risque plus important que le TC léger. D'après (Christensen et al., 2009).

III.6.4. Risque de maladie neurodégénérative

De plus en plus de preuves montrent que le TC favorise l'accumulation, le mauvais repliement et l'agrégation de plusieurs protéines anormales associées à la neurodégénérescence comprenant les peptides β -amyloïdes, les protéines précurseurs de l'amyloïde, tau, α -synucleïne et neurofibrillaires (Maas et al., 2017; McKee & Daneshvar, 2015). Un TC sévère est associé à un risque multiplié par deux ou quatre de démence tardive (Shively et al., 2012). Une atrophie progressive du cerveau après TC ainsi qu'une intégrité réduite de la substance blanche ont été observées *post mortem* ou par imagerie. Cette atrophie peut refléter une perte volumique, une mort neuronale, une réduction de la prolifération et/ou de la survie neuronale (Farbota et al., 2012; Green et al., 2014; Vasquez et al., 2018). Graham *et al.* (2020) suggèrent que l'étendue et l'emplacement des lésions axonales diffuses prédisent la dégénérescence de la substance blanche après un TC. Quelques heures après un TC sévère, une accumulation de protéines précurseurs de l'amyloïde est évidente dans le tissu cérébral. Ces changements sont associés à une augmentation de la concentration cérébrale de peptides

amyloïdes-A β_{42} solubles et des dépôts de plaques A β diffuses chez 30 % des patients traumatisés sévères (DeKosky & Asken, 2017).

L'**encéphalopathie traumatique chronique** (encéphalite traumatique pugiliste ou démence pugiliste) a été signalée pour la première fois par Harrison Martland en 1928, lorsqu'il examina des boxeurs professionnels à la retraite (Martland, 1928). Cette pathologie concerne principalement les TC légers répétés, retrouvés chez les sportifs professionnels de contact (ex. boxe, football américain, rugby) mais aussi le TC sévère chez les anciens combattants. Les signes et les symptômes comprennent la dysarthrie, les troubles de la marche, les tremblements, l'irritabilité, l'impulsivité, l'agressivité, la dépression et les troubles cognitifs allant jusqu'à la démence. L'encéphalopathie traumatique chronique est définie comme une tauopathie, c'est-à-dire d'une accumulation de la protéine tau hyperphosphorylée dans certaines zones cérébrales. C'est une maladie progressive conduisant à de multiples manifestations somatiques et cognitives (DeKosky et al., 2013). Au stade avancé, des changements neurologiques plus graves se développent (démence, parkinsonisme) pouvant être cliniquement confondus avec la maladie d'Alzheimer ou de démence frontotemporale.

Le TC semble augmenter aussi le risque de la **maladie d'Alzheimer**, d'autant plus si le TC est sévère. Un étude longitudinale portant sur les vétérans de la seconde Guerre Mondiale démontre un risque accru de cette maladie en fin de vie lié à la gravité du TC (aucun risque pour un TC léger) (Corkin et al., 1989). Le TC est associé à une apparition précoce de la maladie d'Alzheimer, pouvant aller jusqu'à 8 ans avant l'âge moyen d'apparition de la maladie dans la population générale (Krueger et al., 2011; McKee & Daneshvar, 2015; Nemetz et al., 1999). Le lien entre le TC et la maladie d'Alzheimer semble provenir de l'accumulation intra-axonale de protéines A β et tau ainsi que de la protéine neurofibrillaire ou α -synucléine.

Le TC sévère pourrait également être impliqué dans d'autres pathologies neurodégénératives comme la sclérose en plaque ou la maladie de Parkinson (McKee & Daneshvar, 2015). Néanmoins, le chevauchement de ces processus dégénératifs rend difficile la distinction de l'implication du TC (Graham, N. et al., 2020).

III.7. Impact social

Ces troubles cognitifs, comportementaux, psychologiques et neurologiques ont un impact important sur la vie quotidienne, sociale et professionnelle des patients traumatisés sévères. Près d'un quart de ces patients ne retournent pas travailler l'année suivant leur accident (Rabinowitz & Levin, 2014), ce qui représente un fardeau considérable pour la société.

III.8. Synthèse sur le traumatisme crânien sévère

Les traumatismes crâniens légers, modérés et sévères partagent des mécanismes de lésions secondaires et l'expression de symptômes similaires, mais diffèrent au niveau de la gravité et du nombre de complications, du temps de récupération et de la proportion de patients affectés. De plus, le TC sévère présente de nombreuses particularités qui en font une pathologie distincte. En effet, ces patients traumatisés se trouvent initialement dans un état de conscience faible (comateux, végétatif ou minimal) avec un état général compromis. De ce fait, une prise en charge hospitalière lourde et une surveillance accrue des facteurs d'agression cérébrale secondaire d'origine systémique (hypotension, hypoxie, pression intracrânienne, mécanisme d'autorégulation, glycémie, etc.) sont nécessaires, et ne sont pas ou peu présents dans les TC légers ou modérés. La proportion des lésions primaires et secondaires est importante et en découlent de nombreux mécanismes biochimiques et moléculaires (ischémie, excitotoxicité, mort cellulaire, inflammation, stress oxydant, rupture de la BHE, etc.) susceptibles d'accroître les lésions initiales avec des dynamiques temporelles distinctes. Les hémorragies, les vasospasmes, l'hydrocéphalie sont plus courants lors d'un TC sévère que chez des patients cérébrolésés légers ou modérés. De plus, des événements tels que les dépolarisations corticales envahissantes et l'activité épileptique, affectant le parenchyme cérébral sont majoritairement voire seulement observés après un TC sévère. Enfin, des lésions neurologiques dans différentes zones du cerveau (les lobes cérébraux, les régions sous-corticales, le cervelet, le tronc cérébral et la substance blanche) aboutissent à des symptômes chroniques, durables à persistants comme des déficits moteurs (hémiparésie, motricité fine, fatigue), cognitifs (mémoire, attention, fonctions exécutives), comportementaux et psychologiques (agressivité, irritabilité, dépression, anxiété, etc.), ainsi que neurophysiologiques (facteurs de risque pour les pathologies neurodégénératives) se développant tout au long de la vie des patients (Figure 22). Ces divers troubles compromettent la réinsertion du patient dans la société et la reprise d'une activité professionnelle. Le TC sévère doit donc être considéré comme une pathologie distincte au vu des taux importants de ces multiples complications lésionnelles, et c'est pourquoi une prise en charge multidisciplinaire et personnalisée est réalisée pour ces patients.

Afin de comprendre les mécanismes neurologiques qui sous-tendent le développement de lésions neurologiques après un TC sévère, nous verrons dans le chapitre suivant les différents modèles *in vitro* et *in vivo* disponibles pour la recherche. Nous passerons en revue l'état actuel des connaissances sur la temporalité des séquelles dans les modèles cellulaires ou animaux au préalable des travaux de cette thèse.

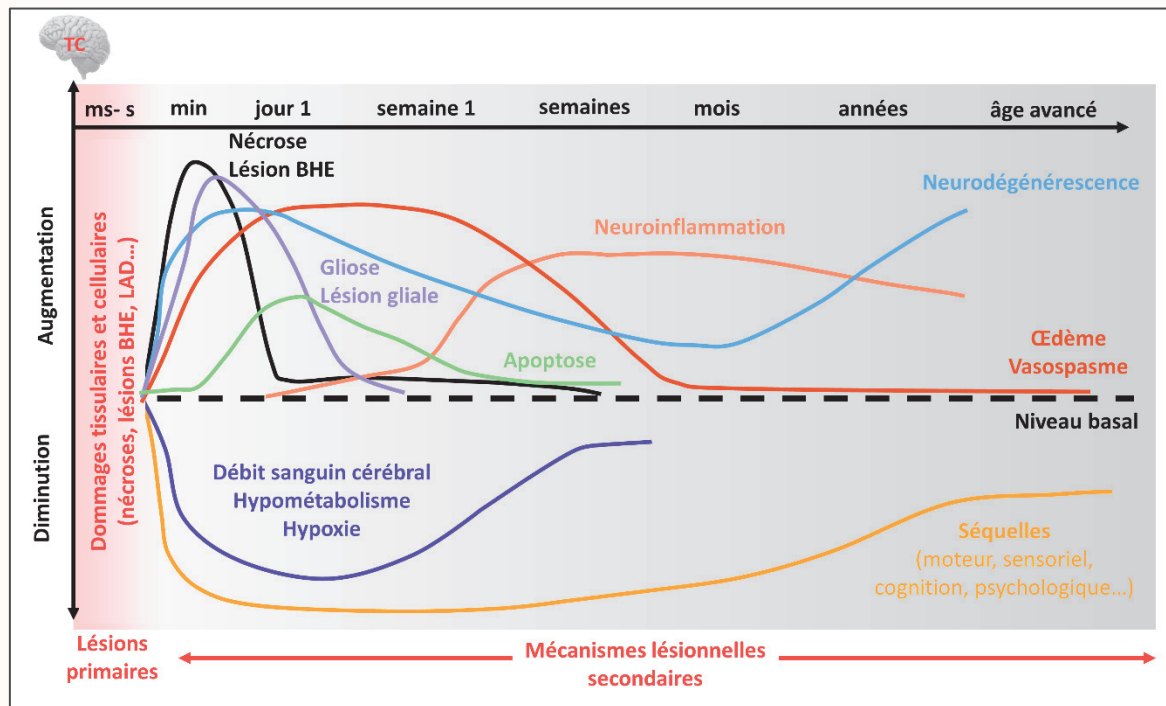


Figure 22. Représentation schématique de l'évolution temporelle des lésions et des séquelles après un traumatisme crânien sévère. Les données précliniques et cliniques en neuroimagerie, des biomarqueurs et des séquelles permettent d'établir une évolution temporelle des lésions primaires et des mécanismes secondaires mis en jeu après un traumatisme crânien sévère. BHE : barrière hémato-encéphalique, TC : traumatisme crânien, LAD : lésion axonale diffuse. D'après (Graham & Sharp, 2019; Maas et al., 2017; Pop & Badaut, 2011).

IV. Modèles expérimentaux

La modélisation d'une pathologie ou d'une lésion consiste à mimer au plus proche la situation rencontrée en clinique chez les patients, dans une préparation expérimentale (cellules, explants, animaux, etc.), afin d'étudier les mécanismes physiopathologiques sous-jacents (tissulaire, cellulaire, moléculaire, biochimique). Les modèles permettent aussi d'évaluer l'efficacité thérapeutique de traitements curatifs. Dans cette partie, nous verrons les différents modèles de TC existants actuellement et les lésions qu'ils produisent. Nous nous intéresserons particulièrement à l'évaluation de la sévérité du TC modélisé.

IV.1. Modèles *in vitro*

Les méthodes *in vitro* présentent l'avantage de pouvoir contrôler les paramètres biomécaniques de la stimulation. Dans les modèles *in vivo*, l'évaluation de la gravité du TC se fait en fonction des lésions neurologiques et des séquelles obtenues plutôt que par l'évaluation biomécanique du stimulus dommageable, ce qui peut contribuer à la variabilité inter-animale. Les informations lésionnelles du tissu aux niveaux cellulaire et moléculaire *in vivo* peuvent être étudiées par l'imagerie (ex. IRM, tomographie par émission de positons, bi-photon) ou par l'implantation intracrânienne de capteurs. Cependant, la compréhension des cascades pathobiologiques (génétiques, protéiques, cellulaires) passe par l'extraction de tissus et est mesurable seulement en *post mortem* (Morrison et al., 2011). Au contraire, les modèles *in vitro* privilégient des études mécanistiques dans lesquelles les conséquences directes du TC aux niveaux cellulaires et moléculaires peuvent être abordées. Ainsi, ces techniques étudient les lésions primaires et secondaires, et parfois leur évolution temporelle sur plusieurs jours ou semaines. De plus, ces modèles permettent d'évaluer des stratégies thérapeutiques potentielles.

IV.1.1. Mécanismes statiques

IV.1.1.a. Modèle par lacération

Les TC pénétrants peuvent infliger une lacération tissulaire localisée se traduisant par une rupture des axones et une mort cellulaire. Ramon y Cajal *et al.* (2012) ont décrit pour la première fois le modèle par lacération. Elle consiste à gratter les neurones adhérents, ou d'autres types cellulaires, dans des plaques de culture à l'aide de stylets en plastique, d'une lame ou de faisceaux laser. La gravité de la lésion varie en fonction du nombre et de la durée des lacérations. Ensuite, l'étendue des lésions est quantifiée en dénombrant les cellules endommagées. Ce modèle a été utilisé pour étudier les effets

secondaires tels que l'excitotoxicité médiée par le glutamate et l'activation gliale. Les avantages du modèle sont son faible coût et sa facilité de mise en œuvre (Kumaria, 2017).

IV.1.1.b. *Modèle par compression*

Les phénomènes de compression sont retrouvés dans le cadre des contusions cérébrales focales, des hémorragies intracrâniennes traumatiques et des lésions de la moelle épinière. Le modèle de compression *in vitro* a été initialement développé sur la moelle épinière afin de reproduire les aspects physiopathologiques observés lors des TC (Balentine et al., 1988). Cette méthode analogue à celle des modèles *in vivo* de chute de poids et d'impact cortical contrôlé, est appliquée à une culture organotypique (Figure 23). La sévérité lésionnelle du traumatisme peut être ajustée en changeant le poids et la hauteur pour l'appareil de chute de poids, et la force, la profondeur, la forme, ainsi que la durée pour l'impacteur (Morrison et al., 2011). Ce modèle engendre des lésions primaires focales, et est particulièrement utilisé pour étudier les mécanismes des lésions secondaires. Néanmoins, la force appliquée et la déformation des tissus sont difficiles à mesurer, empêchant une caractérisation complète de la biomécanique (Kumaria, 2017).

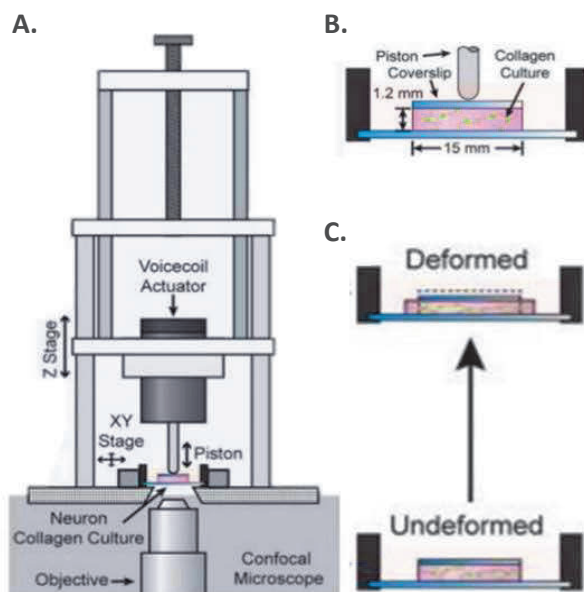


Figure 23. Exemple d'un modèle de compression d'une culture organotypique en 3D. **A.** Représentation du dispositif de compression cellulaire monté sur un microscope confocal pour une analyse spatio-temporelle des lésions. **B.** Le piston va se déplacer linéairement contre une lamelle posée sur la culture de collagène en 3D. Cela induit une déformation compressive **(C)**. D'après (Bar-Kochba et al., 2016).

IV.1.1.c. *Modèle par pression hydrostatique*

Le modèle de pression hydrostatique ou barotraumatique permet un bon contrôle des paramètres lésionnels. Cette méthode peut être réalisée par l'intermédiaire du dispositif de percussion de fluide modifié, d'un lâcher de poids sur une chambre étanche ou par l'utilisation d'une chambre

barotraumatique. Contrairement au modèle de compression décrit précédemment, celui-ci (par la chambre barotraumatique, la plus couramment utilisée) consiste à appliquer une pression quasi-statique (pression constante pendant une période donnée) en augmentant lentement la pression sur les cultures cellulaires afin d'induire des lésions. Pour concevoir des blessures adéquates, l'onde de choc va se propager à travers le tissu (culture cellulaire) au fur et à mesure que la pression augmente, et ainsi déformer le tissu (Shepard et al., 1991). Néanmoins, la vérification de la déformation peut être difficile, tout comme l'induction des lésions, car le tissu cérébral est presque incompressible (Morrison et al., 2011). Pour y pallier, une pression très élevée (ex. 15 atm pendant 10 min) doit être appliquée afin d'infliger des lésions détectables soulevant des questions de transférabilité de ce modèle. L'intérêt de ce modèle se tourne vers l'étude des sous-types de blessures causées lors d'impulsion de surpression d'une explosion (Chen et al., 2009; Kumaria, 2017).

IV.1.2. Mécanismes dynamiques

IV.1.2.a. Modèle par accélération - décélération

Les forces d'accélération-décélération sont des mécanismes lésionnels importants lors d'un TC. Elles créent des forces de cisaillements entraînant des contusions et des lésions axonales diffuses. Une méthode consiste à soumettre le tissu à des accélérations tangentielles à l'aide d'un impacteur, avec un minimum de trois accélérations successives. Cependant, l'estimation de l'intensité de la déformation cellulaire voire tissulaire n'est pas faisable avec cette technique (Chen et al., 2009; Kumaria, 2017).

IV.1.2.b. Modèle par hydrodynamisme

Le modèle par hydrodynamisme a également été créé pour étudier les lésions induites par les forces d'inertie (cisaillement ou étirement) et pour visualiser directement les changements morphologiques sous microscope. Les cellules se développent sur un plateau parallèle à un second plateau rotatif. Puis, elles sont soumises à une force de rotation déterminée par la vitesse angulaire ainsi que par la distance séparant les deux plateaux parallèles. Néanmoins, la déformation est mesurée avec une faible fiabilité et les forces de cisaillement ne sont pas comparables à celles produites *in vivo* (Kumaria, 2017; Morrison, et al., 1998; Morrison et al., 2011).

IV.1.2.c. Modèle de lésion par étirement

Ellis *et al.* (1995) ont développé un modèle cherchant à reproduire la tension et le taux de déformation subis par le système nerveux central lors d'un TC. L'étirement cellulaire consiste à cultiver des cellules sur une membrane en silicone étirable bi-, voire tridimensionnellement par un système

pneumatique (*Cell Injury Controller*, **Figure 24**). La pression et la durée de l'étirement sont contrôlées électroniquement, ainsi une pression de 2,7-4,1 atm pendant 50 ms est considérée comme une lésion sévère. Des expériences sur différentes populations cellulaires (neuronale, astrocytaire, endothéliale, etc.) ont été réalisées afin d'observer les conséquences cellulaires et moléculaires de l'étirement. De plus, d'autres facteurs peuvent être supplémentés à ce mécanisme afin de se rapprocher des événements *in vivo*, comme la privation d'oxygène et de glucose pour mimer l'ischémie (Salvador et al., 2018). Par exemple, Berrout *et al.* (2012) ont utilisé une culture de cellules endothéliales pour reproduire des vaisseaux sanguins et ont observé un dysfonctionnement des cellules endothéliales et une perturbation de la BHE après l'étirement. Ce mécanisme a induit une libération rapide de calcium intracellulaire engendrant une augmentation de NO. La gliose a été étudiée dans ce modèle montrant une augmentation des marqueurs cicatriciels et de GFAP, ainsi qu'une diminution de l'adhésion des neurites et de leur longueur (Wanner et al., 2008).

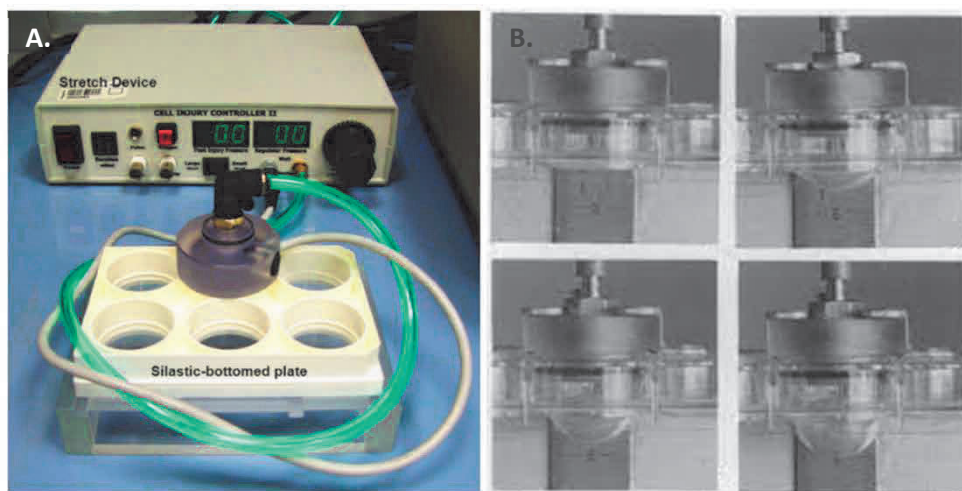


Figure 24. Modèle de lésion par étirement cellulaire. A. Le dispositif comprend une plaque de six puits où les cellules sont cultivées sur une membrane en silicone et d'un système pneumatique reliant la plaque par un bouchon étanche de la taille d'un puit. Au-dessus des cellules se trouve une couche de milieu de culture contenant des nutriments, de l'oxygène et les déchets cellulaires (débris des cellules, métabolites, etc.). B. Positionnement du bouchon sur un puit par lequel de l'air va être libéré à une pression et à un temps donné. L'impulsion d'air va venir déformer la membrane en silicone et les cellules. La pression et la durée permettent de contrôler la gravité des lésions. D'après (Ellis et al., 1995; Salvador et al., 2018).

IV.1.3. Bilan

Ces différents modèles suscitent un intérêt pour la compréhension mécanistique des lésions. Cependant, ces techniques ne tiennent pas compte de l'ensemble du tissu cérébral et des différentes populations cellulaires impliquées lors du TC, ni des complications post-traumatiques comme les séquelles neurologiques ou cognitives. Ainsi, les modèles *in vitro* seraient une représentation trop simpliste et réductrice du traumatisme crânien. Dans le TC, il y a une interaction entre le cerveau et les organes périphériques (ex. ACSOS) ainsi qu'avec les systèmes immunitaire (inflammation) et endocrinien. Les modèles *in vitro* ne permettent pas de prendre en compte ces interactions. Au contraire, les modèles *in vivo*, donc chez l'animal, prennent en compte ces interactions. **Nous avons donc décidé de nous tourner vers un modèle *in vivo* afin d'étudier les déficits post-traumatiques et leur évolution temporelle.**

IV.2. Histoire et éthique animale

L'emploi d'animaux dans la recherche scientifique est contrôlé pour les protéger et les respecter, mais aussi pour s'assurer d'une reproductibilité adéquate dans les résultats. Nous retraçons dans cette partie quelques notions et dates clés sur l'évolution et l'éthique dans l'expérimentation animale.

La recherche animale a été décrite dès l'Antiquité.

- Aristote (384 - 322 av. J. C.) ou encore Anaxagore de Clazomènes (500 - 428 av. J. C.) ont pratiqué des dissections anatomiques sur les animaux (singes, porcs, chèvres, etc.). Aristote plaçait l'animal sous l'homme en le justifiant par leur irrationalité.
- Galien (129 - 201) a eu recours aux animaux jugés les plus semblables à l'homme pour des démonstrations physiologiques et anatomiques.

Georges Chapouthier, neurobiologiste et philosophe, suggère qu'à cette époque les scientifiques se souciaient de ne pas heurter la sensibilité du public et évoque que Galien préconisait d'effectuer certaines opérations extrêmement douloureuses sur les porcs plutôt que sur des singes (Animal Testing, 2018).

- Au XVII^e siècle, l'expérimentation animale est devenue incontournable pour la recherche en biologie et santé. La philosophie cartésienne se refusait de croire à la souffrance possible des animaux. Descartes (1596 - 1650) soutenait que les animaux n'avaient ni âme ni esprit et n'étaient que des automates (théorie de l'animal-machine) (Charles, 2006).

- Au XVIII – XIXe siècles, deux écoles s’opposent. Georges Cuvier (1769 - 1832) qui favorise les études en laboratoire contre Geoffroy Saint-Hilaire (1772 - 1844) qui privilégie l’observation des animaux dans leur habitat naturel. Néanmoins, Charles Darwin (1809 - 1882) insistait sur une continuité entre l’homme et l’animal dans son ouvrage « *On the Origin of Species* ».
- Edward Lee Thorndike (1874 - 1949) est l’un des précurseurs de **l’expérimentation animale contrôlée**.
- Claude Bernard (1813 - 1878) est l’un des fondateurs de la médecine expérimentale et a développé les principes fondamentaux de la physiologie qui reposent sur des « vivisections zoologiques » en **utilisant des anesthésiants**. Il justifiait l’utilisation des animaux ainsi : « s’il est immoral de faire sur un homme une expérience dès qu’elle est dangereuse pour lui, quoique le résultat puisse être utile aux autres, il est essentiellement moral de faire sur un animal des expériences, quoique douloureuses et dangereuses pour lui, dès qu’elles peuvent être utiles pour l’homme » (Animal Testing, 2018).
- Au début du XXe siècle, les souris, les rats, les mouches et les nématodes sont privilégiés comme modèles d’études.
- Suite aux atrocités perpétrées lors de la seconde guerre mondiale, le « code de Nuremberg » – article 3 (1949) stipule que les expérimentations chez l’homme doivent s’appuyer sur des résultats d’expériences réalisées chez l’animal (Tribunals, 1949).
- Russel et Burch (1959) ont développé le **principe des 3R** : Remplacer, réduire et raffiner.
- La loi du 10 juillet 1976 (Loi de Nungesser), article L-241-1 du code rural acte que l’animal est un « **être sensible** ». L’article L 241-3 interdit d’« exercer des mauvais traitements envers les animaux domestiques ainsi qu’envers les animaux sauvages apprivoisés ou tenus en captivité ».
- La **directive européenne de 1986 (86/609/CEE)** encadre l’expérimentation animale, notamment sur l’obligation de recourir à l’animal s’il n’existe pas de méthode alternative. Elle demande également de déclarer les protocoles douloureux.
- La Charte nationale portant sur l’éthique de l’expérimentation animale est écrite pour une réalisation morale et responsable de l’animal à des fins scientifiques. Elle normalise la composition et le fonctionnement des comités d’éthique. Cette chartre est régulièrement revue (Parodi, 2009).
- La **directive européenne 2010/63/UE** impose le principe des 3R et stipule que « s’il est souhaitable de remplacer l’utilisation d’animaux vivants dans les procédures par d’autres méthodes qui n’impliquent par leur utilisation, l’utilisation d’animaux vivants demeure nécessaire pour protéger la santé humaine et animale ainsi que l’environnement ».

- Le **Décret 2013-118 du 1^{er} février 2013** transpose la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques en **droit français**. De plus, l'évaluation éthique des projets est obligatoire par un comité d'éthique et des Structures chargées du Bien-Etre Animal sont mises en place dans les établissements utilisateurs ou éleveurs.
- Le code civil 28/01/2015 (article 515 - 514) déclare que l'animal est un « être vivant doué de sensibilité ».

Au cours de ce projet de thèse, l'effet du modèle de TC sévère sur le bien-être animal a été évalué afin d'encadrer le mal-être et la souffrance animale.

IV.3. Modèles *in vivo*

Comme nous l'avons vu, les modèles *in vitro* sont réducteurs et minimalistes pour reproduire des lésions engendrées lors d'un TC sévère, c'est pourquoi nous nous sommes tournés vers un modèle animal. Il est évident qu'aucun modèle ne peut reproduire parfaitement l'intégralité des changements pathologiques causés par le TC. Néanmoins, ils contribuent à clarifier les mécanismes lésionnels aboutissant aux séquelles persistantes, ainsi que l'efficacité de nouveaux traitements. Le TC a été modélisé chez de nombreuses espèces choisies pour leur proximité phylogénétique avec l'homme ou pour la structure gyrencéphalique de leur cerveau (chat, chien, furet, porc, primate). Les rongeurs ont été les plus utilisés en raison de leur petite taille, de leur faible coût, de leur facilité de reproduction et de l'opportunité de travailler avec des animaux génétiquement modifiés. Dans le cas des modèles du TC, les rats ont une place de prédilection.

Au cours du temps plusieurs modèles *in vivo* pour le TC ont émergé avec des variations du mécanisme, des outils et du site de l'induction. Les modèles du TC sont généralement classés en fonction du mode d'induction du traumatisme pouvant être réalisé par impact direct sur le cortex (crâne ouvert, avec ou sans pénétration) ou boîte crânienne fermée.

IV.3.1. Boîte crânienne fermée

Les modèles non pénétrants sont réalisés crâne fermé ce qui limite le biais de la chirurgie. Ces méthodes se tournent principalement vers l'étude des lésions cérébrales diffuses.

IV.3.1.a. *Modèle de lâcher de poids - crâne fermé*

Le premier modèle de lâcher de poids (*closed head injury*) a été proposé par Marmarou *et al.* (1994) chez le rat afin de reproduire des lésions diffuses retrouvées dans le cas d'un accident de la route (phénomène d'accélération-décélération) ou d'une chute. Cela consiste à lâcher un poids en laiton qui tombe librement à la verticale, d'une hauteur définie à travers un tube sur le crâne de l'animal (**Figure 25**). Pour cela, les poils du dessus du crâne sont rasés et une incision médiale est pratiquée. Un disque en acier inoxydable est fixé avec de l'acrylique dentaire directement sur le crâne entre le bregma et le lambda, au niveau de la ligne médiane afin de limiter la fracture osseuse et pour distribuer l'énergie cinétique sur l'ensemble du cerveau (Kalish & Whalen, 2016). Certains auteurs ont utilisé ce dispositif en positionnant le disque latéralement (modèle de Shohami) pour augmenter les lésions focales. La gravité des lésions cérébrales dépend de la hauteur et de la masse du poids utilisé. Ainsi, un TC sévère avec des lésions diffuses est induit avec un poids d'au moins 450 g et lâché d'une hauteur de 1,5 à 2 m (Ma *et al.*, 2019). Le taux de mortalité est de 40 à 70 % mais peut être réduit par la ventilation mécanique (Xiong *et al.*, 2013). Ce modèle est caractérisé par les lésions diffuses et bilatérales des neurones, des axones, des dendrites, de la microvascularisation avec une instabilité de la BHE, et de la substance blanche (Albert-Weissenberger & Sirén, 2010). En plus des dommages cérébraux et cérébelleux, ce dispositif peut également impacter le tronc cérébral (Cernak, 2005; van de Looij *et al.*, 2012). Au niveau comportemental, les animaux présentent des déficits sensori-moteurs, cognitifs et neurologiques persistants sur au moins un mois (Bücheler *et al.*, 2016). L'étude d'Arulsamy *et al.* (2019) montre une altération subtile de la flexibilité cognitive 12 mois après le TC sévère chez le rat impliquant le cortex frontal et préfrontal. Une activation microgliale et astrocytaire ainsi qu'une neurodégénérescence accompagnées de modifications morphologiques ressemblant à celles retrouvées en clinique chez l'homme ont été observées (Mohamed *et al.*, 2020). Ce modèle est simple et rapide à mettre en œuvre. Toutefois, il montre certains inconvénients tels qu'une imprécision concernant le site de lésion, la reproductibilité, le taux de mortalité et le risque involontaire d'une deuxième blessure suite à un rebond du poids. Cependant, des méthodes existent pour limiter le rebond par la fixation d'une corde au poids ou le placement de l'animal sur un morceau de papier non rigide permettant à l'animal de tomber à travers, lors de l'impact, et d'atterrir sur un coussin en mousse à quelques centimètres plus bas (Bodnar *et al.*, 2019).

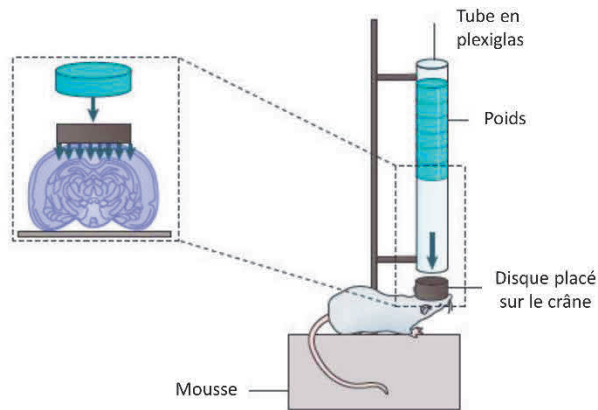


Figure 25. Modèle du lâcher de poids de Marmarou. Un poids est lâché librement dans un tube afin d'être guidé directement sur la tête de l'animal. Au préalable, un disque est positionné sur le crâne sous anesthésie afin de limiter la fracture osseuse et pour diffuser l'énergie provenant de la force gravitationnelle. D'après (Xiong et al., 2013).

IV.3.1.b. *Modèle d'accélération-rotation*

L'accélération rotationnelle de la tête est souvent une caractéristique des TC provoqués par une chute ou un accident de la route (impulsion de la tête avec un arrêt sec) ou dans le cadre des sports de contact (ex. football américain, sport de combat). Sous anesthésie, le crâne de l'animal est fixé à un axe de rotation muni d'une barre. Un projectile va percuter la barre, entraînant une rotation de la tête de l'animal vers l'arrière (plan sagittal). Cela provoque une phase d'accélération, suivi d'une rotation puis d'une décélération moindre lorsque la barre rencontre une butée rembourrée (Figure 26). La pression d'air expulsant le projectile peut être ajustée pour moduler la sévérité du modèle. Il en résulte des lésions axonales diffuses dans le corps calleux, la substance blanche sous-corticale et le tronc cérébral mais aussi un œdème cérébral, une mort cellulaire et une perméabilité de la BHE. Néanmoins, ce modèle est principalement documenté pour du TC léger à modéré et des TC répétés (McNamara et al., 2020; Risling & Davidsson, 2012; Rostami et al., 2012).

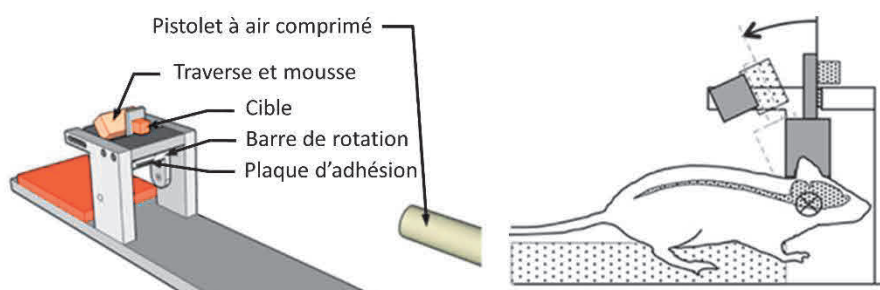


Figure 26. Modèle d'accélération rotationnelle. L'os du crâne est fixé à une plaque métallique installée sur la barre de rotation. Un projectile va venir taper contre une cible entraînant la rotation de la tête de l'animal. D'après (Risling & Davidsson, 2012; Rostami et al., 2012).

IV.3.1.c. Modèle d'explosion

Le modèle d'explosion (*blast injury*) a été développé suite aux nombreux cas de militaires ayant eu un diagnostic d'un TC après avoir été exposés à une explosion sans blessure externe. L'animal est placé soit à l'intérieur, à la sortie ou à l'extérieur d'un tube métallique fermé à une extrémité, puis une onde de souffle est induite à l'intérieur par une explosion ou une surpression d'air (Figure 27). Les animaux sont généralement anesthésiés et positionnés sur un porte-objet. Le souffle de l'explosion provoque un mouvement du cerveau à l'intérieur du crâne. Pour limiter la rotation de la tête, les animaux peuvent être retenus par un filet. La gravité du TC dépend de l'intensité du souffle et se reflète dans le taux de mortalité. Ainsi, un TC sévère a été défini pour une pression de 190 KPa et produit un taux de mortalité de 53 % chez le rat. Une surpression explosive de 221-290 KPa est considérée comme un TC sévère avec un très fort taux de mortalité de 70 % chez le rat (Mishra et al., 2016). L'onde de choc produit des dommages axonaux diffus en particulier pendant les deux premières semaines, un œdème cérébral, des vasospasmes, des lésions de la BHE mais aussi des lésions pulmonaires, une bradycardie et des effets systémiques y compris de l'hypotension et de l'hypoxémie (DeWitt & Prough, 2009; Xiong et al., 2013). Cependant, aucune description histologique complète, ou des effets de ce modèle sur le comportement n'est disponible dans la littérature à notre connaissance. Ce modèle nécessite un appareillage spécifique et ainsi que coûteux, et présente une grande diversité tant par les moyens d'induction, le nombre d'ondes produites que par le positionnement de l'animal. Ce modèle est donc difficile à standardiser (Ma et al., 2019).

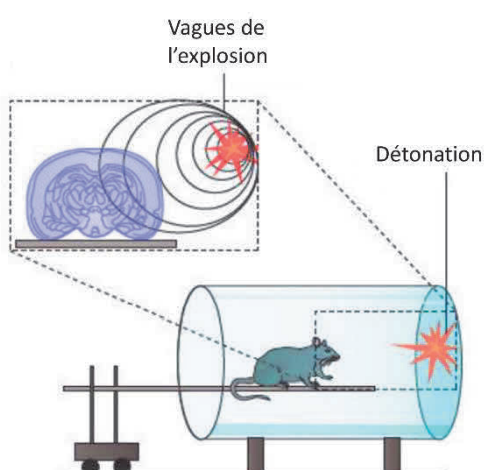


Figure 27. Modèle d'explosion. L'animal est positionné au plus proche d'un tube métallique et une onde de choc est provoquée à la suite d'une explosion ou d'une surpression. D'après (Xiong et al., 2013).

IV.3.2. Boîte crânienne ouverte

Les modèles animaux dits « pénétrants » ont au préalable une craniotomie réalisée sous anesthésie. L'induction du TC consiste à percuter directement la dure-mère et le cortex cérébral. Cela conduit principalement à une lésion focale au site de l'impact, avec l'existence possible de lésions axonales diffuses.

IV.3.2.a. Modèle de lâcher de poids - crâne ouvert

Ce modèle diffère de celui présenté dans la partie précédente par la réalisation d'une craniotomie afin que le poids impacte directement la dure-mère (**Figure 28**). Il a été développé par Feeney *et al.* (1981) afin de comprendre l'évolution des contusions corticales. La gravité des lésions peut être modifiée en ajustant la masse du poids et la hauteur de sa chute, qui sont souvent inférieures à celles utilisées pour le modèle crâne fermé. Les lésions sont principalement focales aux niveaux des substances blanche et grise de la zone d'impact. Elles progressent à partir des hémorragies de la substance blanche sous le cortex jusqu'à former une cavité nécrotique au cours des 24 premières heures. Cette cavitation semble s'étendre au cours des deux semaines suivant le TC, mais généralement une récupération fonctionnelle est observée pendant cette même période. Toutefois, certains déficits moteurs semblent persister jusqu'à 90 jours (Feeney *et al.*, 1981; Ma *et al.*, 2019; Xiong *et al.*, 2013).

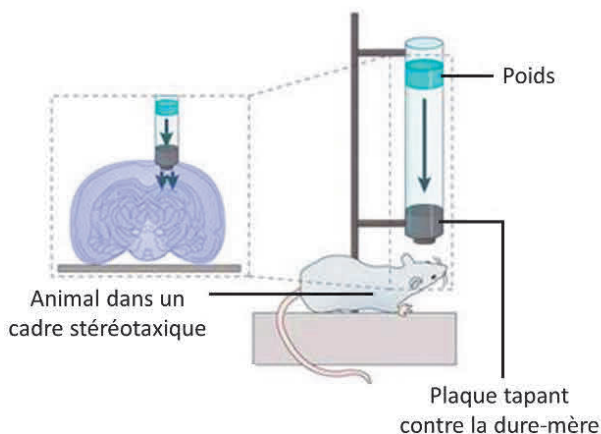
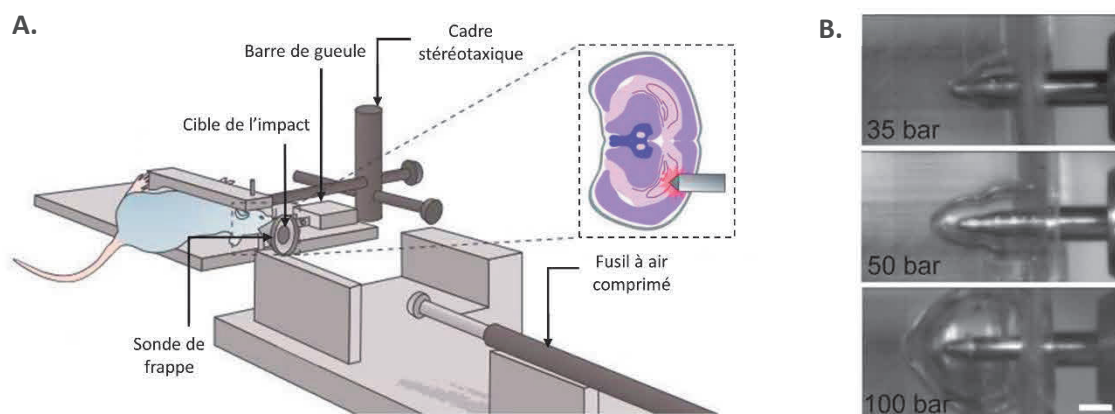


Figure 28. Modèle de lâcher de poids de Feeney. Une craniotomie est réalisée pour mettre en apparence la dure-mère puis un poids est librement lâché pour venir percuter la dure-mère. D'après (Xiong *et al.*, 2013).

IV.3.2.b. Modèle par pénétration balistique

Une lésion cérébrale traumatique pénétrante se produit lorsqu'un objet heurte la tête avec suffisamment d'énergie pour pénétrer la peau, l'os et le parenchyme cérébral. Ce type de blessure est courant dans les zones de conflits armés ou de violences liées aux armes à feu et aux objets

contendants. Le modèle initial a été proposé par Williams *et al.* (2005), et utilise une sonde gonflable insérée dans le cerveau de rats anesthésiés puis rapidement gonflée. Depuis, le modèle proposé par pénétration balistique (*penetrating ballistic-like brain injury*) est causé par la pénétration d'un projectile à grande vitesse dans le cerveau, produisant une cavité temporaire plus grande que le volume de l'objet pénétrant (**Figure 29**) (Plantman, 2015). La gravité du modèle est directement liée à la vitesse, à la trajectoire du projectile et au degré de transfert d'énergie. La pénétration du projectile induit une dégénérescence des substances blanche et grise, accompagnée d'hémorragie, d'œdème, de gliose réactive, d'une neuroinflammation et d'une augmentation de la pression intracrânienne au cours de la première semaine post-TC. De plus, des crises d'épilepsie convulsives et des dépolarisations corticales envahissantes ont été observées. Les animaux présentaient des troubles moteurs et cognitifs en corrélation avec le degré de gravité de la blessure au cours du premier mois après le TC (Cernak et al., 2014; Plantman, 2015; Shear et al., 2010). Cependant, par rapport à d'autres modèles de TC, il induit une hémorragie intracérébrale étendue dans toute la lésion primaire, en raison de la nature pénétrante de la blessure et de la cavité formée. De plus, la quantité d'énergie délivrée est difficile à évaluer avec exactitude (Xiong et al., 2013).



IV.3.2.c. *Modèle d'impact cortical contrôlé*

Le modèle d'impact cortical contrôlé induit principalement des lésions focales. L'induction du TC est réalisée par un dispositif pneumatique ou électromagnétique permettant de diriger un impacteur rigide sur la dure-mère intacte, préalablement exposée suite à une craniotomie (Figure 30). Généralement, celle-ci est réalisée latéralement entre le bregma et le lambda mais elle peut être médiale. L'impact provoque une déformation du cortex sous-jacent (Dixon et al., 1991). L'avantage de ce modèle, par rapport aux autres, est la facilité avec laquelle les caractéristiques de l'impact telles que la durée, la vitesse et la profondeur peuvent être contrôlées, et donc la maîtrise de la sévérité du traumatisme. De plus, le risque de blessure par rebond est absent. Les lésions cérébrales sont similaires à celles observées dans les cas cliniques de TC lors d'un accident de la route ou de chute. De plus, le taux de mortalité est faible car aucun dommage au tronc cérébral ne se produit (Morales et al., 2005). Ce modèle induit un hématome sous-dural aigu, une commotion, un œdème cérébral, la mort neuronale principalement au site de l'impact, des lésions de la BHE, une astrogliose, des événements inflammatoires et des lésions axonales (diffuses lors d'une craniotomie latérale). De plus, des dépolarisations corticales envahissantes et des crises post-traumatiques associées à l'épilepsie ont été rapportées (Albert-Weissenberger & Sirén, 2010). Les altérations fonctionnelles observées englobent les déficits sensorimoteurs, l'anxiété et les troubles cognitifs (détectés avec le labyrinthe aquatique de Morris) persistant jusqu'à un an après le TC et peuvent être associés à une atrophie cérébrale et une diminution progressive du flux sanguin cérébral (Xiong et al., 2013). Ce modèle induit une déformation profonde du tissu qui mime les lésions par pénétration conduisant à une cavitation (Gold et al., 2013). Ces dommages sont fortement liés à la profondeur de la déformation et à la vitesse d'impact. Cependant, les TC sévères induits par ce modèle lèsent une grande partie de l'hémisphère, ce qui ne rentre plus dans un cadre clinique compatible avec la survie (Marklund, 2016). Il faut également noter que ce dispositif est coûteux et complexe à mettre en œuvre.

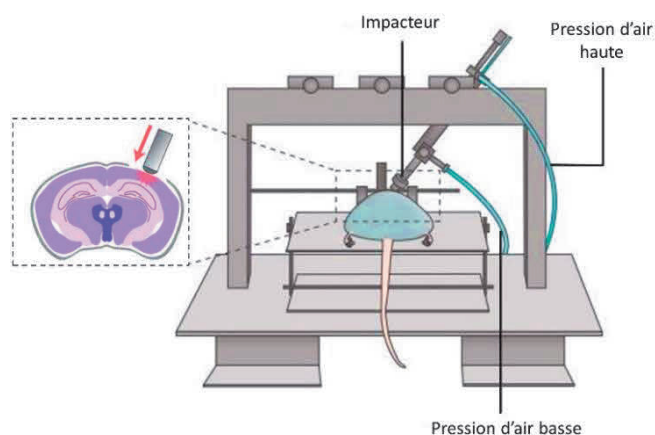


Figure 30. Modèle d'impact cortical contrôlé. Un impacteur rigide, actionné par un dispositif pneumatique ou électromagnétique, va frapper contre la dure-mère exposée et intacte, à une vitesse et une distance connues. D'après (Pitt et al., 2020; Xiong et al., 2013).

IV.3.2.d. Modèle de percussion de fluide

Le modèle de lésion par percussion de fluide est le plus couramment utilisé et a été conçu pour induire un TC sans fracture du crâne. Dans ce modèle, une craniotomie est effectuée sous anesthésie, sur la suture sagittale ou en pariétale entre le bregma et le lambda. L'animal est connecté à un réservoir équipé d'un piston et contenant de l'eau stérile et dégazéifiée. Un maillet est ensuite lâché pour venir frapper le piston, ce qui induit une brève impulsion de fluide à la surface de la dure-mère intacte (**Figure 31**). Une faible quantité d'eau s'infiltré rapidement dans l'espace épidual provoquant une déformation du tissu cérébral (Clausen et al., 2019). Dans certains cas, une tubulure remplie de sérum physiologique fait la jonction entre l'appareil et l'animal, impliquant une diminution de la pression au niveau de la dure-mère (Selwyn et al., 2013). La modification de l'amplitude du lâcher du maillet, et donc de la pression induite dans la colonne d'eau, permet de moduler la sévérité du TC. Plus récemment, un modèle de percussion de fluide commandée par un microprocesseur via un dispositif pneumatique a été proposé. Il peut surveiller les formes d'onde de percussion de fluide avec des temps de montée, des pressions de crête et des durées réglables, améliorant la fiabilité du modèle (Kabadi et al., 2010; Wahab et al., 2015).

Les lésions engendrées dans le modèle de percussion de fluide dépendent de l'emplacement de la craniotomie reproduisant des lésions diffuses (percussion médiane) ou mixtes avec des lésions diffuses et focales (percussion latérale, LFP) qui sont fréquemment observées à la suite d'un TC chez l'homme. En effet, les lésions mixtes sont observées lors de blessures à la tête résultant de chutes ou de blessures sportives (Ma et al., 2019). Les premières tentatives de modélisations du TC *in vivo* par une impulsion de sérum physiologique contre la dure-mère ont été réalisées chez le chat puis le lapin, mais aussi le chien, le porc et le mouton (Lyeth, 2016). Stalhammar *et al.* (1975) ont amélioré le contrôle de la durée et de l'amplitude de l'onde de choc fluide chez le lapin. Par la suite, Thompson et McIntosh, ont modifié ce dispositif pour aboutir à celui connu actuellement (Thompson et al., 2005). La technique a ensuite été adaptée chez le rat, puis la souris (Carbonell et al., 1998; Dixon et al., 1987).

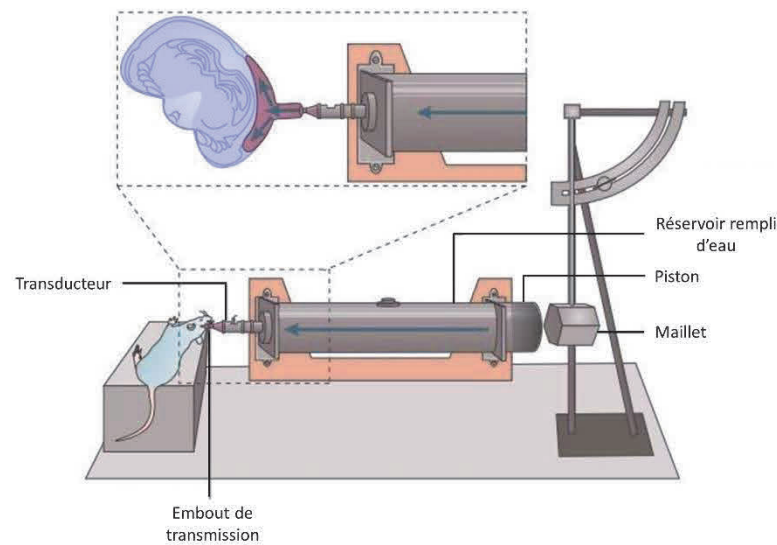


Figure 31. Modèle de percussion latérale de fluide. Un animal ayant eu au préalable une craniotomie sous anesthésie est positionné contre une colonne d'eau (réservoir). Un maillet est lâché suivant un angle défini et va frapper le piston. Cela induit une onde de choc qui se propage dans le réservoir et un faible volume d'eau va rapidement s'infiltrer dans l'espace épidural provoquant une déformation du tissu cérébral. D'après (Xiong et al., 2013).

Le modèle de LFP génère une hypertension vasculaire transitoire, une pression intracrânienne élevée, un œdème cérébral, une hémorragie et des lésions de la substance grise dans les régions cortico-focales mais aussi temporales, dans l'hippocampe, au niveau de l'amygdale et du thalamus, du côté ipsilatéral à l'onde de choc. Les régions fortement touchées par la perte neuronale sont souvent éloignées du site d'impact, par exemple le cortex temporal ou le thalamus (Balanca et al., 2015; Liu et al., 2010; Ma et al., 2019; Pfenninger et al., 1989; Thompson et al., 2005). Les principales lésions sont la contusion, le cisaillement/l'étirement des tissus, l'hématome sous-dural et l'hémorragie intracrânienne. S'ensuivent des mécanismes secondaires comprenant des perturbations vasculaires et du flux sanguin cérébral (rupture/perméabilité de la BHE), la mort cellulaire (nécrotique dans un premier temps puis apoptotique), l'activation des astrocytes et de la microglie accompagnée d'une neuroinflammation. Une neurodégénérescence s'installe dès les premières minutes et perdure jusqu'à un an après le TC (Liu et al., 2010). Une cavitation peut s'installer au niveau du cortex, ainsi qu'une dilatation ventriculaire (Marklund, 2016). Ces divers processus vont provoquer des modifications comportementales chez l'animal telles que la suppression des réflexes, des troubles vestibulomoteurs, et des problèmes cognitifs, notamment de mémoire. Ces dysfonctionnements peuvent persister jusqu'à un an après le TC (Pierce et al., 1998). Ces lésions et ces déficits sont souvent retrouvés chez les patients traumatisés sévères (Ma et al., 2019; Morales et al., 2005).

Un inconvénient du modèle de LFP réside dans une mortalité élevée par rapport aux autres modèles, probablement causée par une atteinte du tronc cérébral lors de la déformation tissulaire, induisant un arrêt respiratoire mais aussi un œdème pulmonaire neurogène (Cernak, 2005). L'ajustement de la sévérité ne peut être finement paramétré car il dépend de l'angle du maillet défini manuellement. De plus, la reproductibilité des lésions n'est pas parfaite car elle est impactée par l'emplacement de la craniotomie. Un léger décalage de 1 à 2 mm par rapport à la ligne médiane peut affecter les résultats (Floyd et al., 2002 ; Ma et al., 2019 ; Vink et al., 2001). À cela, les caractéristiques du flux injecté (le volume, la direction, la déformation tissulaire et la vitesse) sont influencées par la géométrie de la surface de contact (ex. craniotomie, épaisseur, élasticité et texture de la dure-mère) et peuvent amener à des disparités interindividuelles (Dixon et al., 1988 ; O'Connor et al., 2011).

Malgré ces inconvénients, ce modèle offre la possibilité de recueillir des données physiopathologiques à la suite des lésions cérébrales dans un environnement similaire au TC chez l'Homme.

IV.3.3. Bilan et choix du modèle

Chaque modèle présente un intérêt clinique suivant le type de TC visé ou les particularités lésionnelles recherchées. Le TC sévère ne peut être modélisé en un unique modèle, et ceux proposés actuellement confèrent des avantages et des inconvénients au regard de l'aspect clinique (représentation des lésions), de la sévérité, de la reproductibilité, du coût ou encore de sa mise en œuvre (**Tableau VI**).

Tableau VI. Résumé des caractéristiques des modèles animaux de traumatisme crânien. TC : traumatisme crânien, DCE : dépolarisation corticale envahissante. Pas de score : score neurologique de sévérité non applicable. D'après (Akamatsu & Hanafy, 2020; Ma et al., 2019; O'Connor et al., 2011; Pinkernell et al., 2016; Xiong et al., 2013).

Modèles	Types de lésion	Avantages	Inconvénients	Représentations cliniques
Non pénétrant (crâne fermé)				
Lâcher de poids (Marmarou)	Diffuse	<ul style="list-style-type: none"> • Pertinence clinique • Score sévérité immédiat • Bien caractérisé • Facile à mettre en place 	<ul style="list-style-type: none"> • Difficilement reproductible • Taux de mortalité élevé • Risque d'une deuxième blessure par rebond • Risque de fracture du crâne 	<ul style="list-style-type: none"> • Chutes • Accidents de la circulation
Par inertie/accélération	Diffuse	<ul style="list-style-type: none"> • Pertinence clinique 	<ul style="list-style-type: none"> • Difficile à mettre en place • Taux de mortalité élevé • Coût 	<ul style="list-style-type: none"> • Accidents de la circulation • Sports extrêmes
Explosion	Diffuse	<ul style="list-style-type: none"> • Pertinence clinique 	<ul style="list-style-type: none"> • Difficile à mettre en place • Manque de standardisation • Coût 	<ul style="list-style-type: none"> • Accélération/décélération • Cas de conflits militaires
Pénétrant (crâne ouvert)				
Lâcher de poids (Feeney)	Focale	<ul style="list-style-type: none"> • Pertinence clinique • Bien caractérisé • Peu coûteux 	<ul style="list-style-type: none"> • Craniotomie • Taux de mortalité élevé • Risque d'une deuxième blessure par rebond 	<ul style="list-style-type: none"> • Chutes • Accident de la circulation • TC avec objet contendant
Pénétration balistique	Focale	<ul style="list-style-type: none"> • Pertinence clinique • Sévérité possiblement ajustable 	<ul style="list-style-type: none"> • Craniotomie • Taux de mortalité élevé • Manque de standardisation • Coût 	<ul style="list-style-type: none"> • Blessures par balles
Impact cortical cérébral	Focale	<ul style="list-style-type: none"> • Pertinence clinique • Sévérité hautement ajustée • Bonne reproductibilité • Faible taux de mortalité • Epilepsie • DCE 	<ul style="list-style-type: none"> • Craniotomie • Pas de score immédiat après la blessure • Absence de déformation du tronc cérébral • Coût 	<ul style="list-style-type: none"> • Chutes • Accidents de la circulation • Déformation directe du cerveau • Contusion cérébrale avec hémorragie sous-arachnoïdienne • Pénétration/contendant à haute sévérité
Percussion latérale de fluide	Mixte	<ul style="list-style-type: none"> • Pertinence clinique • Sévérité ajustable • Bien caractérisé • Reproductibilité modérée • Epilepsie • DCE 	<ul style="list-style-type: none"> • Craniotomie • Pas de score immédiat • Taux de mortalité élevé • Coût 	<ul style="list-style-type: none"> • Chutes • Accidents de la circulation • Déformation directe du cerveau • Contusion cérébrale avec hémorragie

Au cours de cette thèse, nous avons particulièrement recherché à modéliser le TC sévère. À notre connaissance, les seuls modèles animaux permettant d'atteindre ce niveau de sévérité sont le LFP, l'impact cortical contrôlé, le lâcher de poids, le modèle à pénétration balistique et le modèle d'accélération. Lorsqu'ils sont induits à une forte intensité, ces modèles peuvent d'ailleurs induire de l'épilepsie post-traumatique ainsi que des dépolarisations corticales spontanées, qui sont des marqueurs du TC sévère en clinique (Keith & Huang, 2019; Pitkänen & Immonen, 2014). Le modèle LFP est disponible au laboratoire et présente l'avantage d'induire des lésions focales et diffuses qui se retrouvent dans les cas cliniques courants lors d'une chute ou d'un accident de la voie publique. De plus, le LFP n'induit pas d'aussi importantes cavitations dans la zone d'impact contrairement au modèle d'impact cortical contrôlé, qui se rapproche dans ce cas d'un TC pénétrant (Figure 32). À cela, ce modèle génère des crises post-traumatiques et des DCE. Il a donc été choisi dans le cadre de cette thèse.

Afin de pallier l'inconvénient mécanistique du modèle LFP, nous avons tenté d'élaborer un modèle LFP en utilisant une valve pneumatique qui permet d'ajuster avec précision la pression délivrée ainsi que sa durée. Cette partie est développée dans les résultats de ce manuscrit.

A. Impact cortical contrôlé **B. Percussion latérale de fluide**

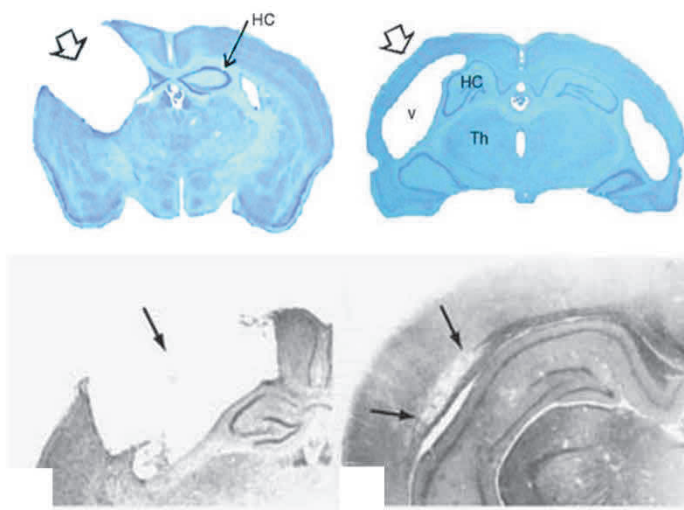


Figure 32. Vue coronale de coupes histologiques de cerveau de deux modèles de traumatisme crânien sévère chez le rat. **A.** Modèle d'impact cortical contrôlé présentant une perte tissulaire importante et donc une cavitation focale dans la zone recevant le TC. **B.** Modèle de percussion latérale de fluide présentant principalement des anomalies diffuses dans le corps calleux et une dilatation ventriculaire ipsilatérale à l'onde de choc. Les flèches blanches (représentations histologiques en haut) montrent la zone d'induction du TC. Les flèches noires (bas) indiquent les lésions corticales. HC : hippocampe, V : ventricule, Th : thalamus. D'après (Kochanek & Dixon, 2015 ; Pitkänen & Bolkvadze, 2010).

IV.4. Evolution lésionnelle dans le modèle LFP

IV.4.1. Contrôle de la sévérité en aiguë

La gravité du TC chez l'homme est définie à partir de l'échelle de Glasgow basée sur les réponses des patients à la commande verbale, motrice et oculaire, mais aussi des données d'imagerie dans le cas des TC sévères. Il est évident que ce procédé ne peut être appliqué dans le cadre des modèles *in vivo*. De ce fait, des stratégies ont été développées pour contourner cette difficulté en se basant sur une combinaison de paramètres comme les caractéristiques du choc appliqué (durée, pression, localisation, etc.), les réponses physiologiques de l'animal (ex. réflexes vestibulaires et fréquence respiratoire) et la physio-anatomie des lésions (ex. cavitation ou perte neuronale). Cependant, ces éléments varient d'un laboratoire à un autre, ainsi qu'entre les différents modèles de TC, ce qui peut limiter la comparaison des données et le transfert des résultats de recherche en clinique. Il n'existe pas de consensus établi pour déterminer avec certitude la sévérité du modèle.

Le premier facteur permettant d'évaluer la gravité du TC induit par LFP est **la force appliquée** sur la dure-mère (Kabadi & Byrnes, 2020). Plusieurs gammes de pressions délivrées ont été proposées. Ainsi, le TC léger est souvent induit pour des pressions de 1 à 2,2 atm, le TC modéré entre 1,8 et 2,8 atm et le TC sévère avec 2,3 à 4 atm (Chitturi et al., 2018; D'Ambrosio, 2004; Kabadi et al., 2010; Kinoshita et al., 2002). Afin d'harmoniser ces gravités, Ma *et al.* (2019) ont proposé des pressions de 0,9 à 1,5 atm (léger), 1,6 à 2,5 atm (modéré) et supérieures à 2,5 atm (sévere), tandis que Kabadi *et al.* (2020) ont conseillé des pressions inférieures à 2,2 atm pour le TC léger, 2,4 à 2,8 pour le TC modéré et supérieures à 2,8 atm pour le TC sévère. Il n'existe pas de consensus clair pour définir la pression correspondant à la gravité du TC induit, sachant que chez l'homme les pressions mises en jeu au cours du TC sont inconnues.

Le taux de mortalité dans la cohorte étudiée est un deuxième indicateur de la sévérité du modèle. Il est suggéré que ce taux soit compris de 0 à 5 % pour le TC léger, 10 à 25 % pour le modéré et supérieur à 33 % pour le sévère (Kabadi et al., 2010; Ma et al., 2019).

L'arrêt respiratoire dans le cas d'un TC sévère peut aller de 10 s (3,75-4 atm) à 45 min (3,8 atm), nécessitant une ventilation mécanique (Balanca et al., 2015; D'Ambrosio, 2004). Cette assistance ventilatoire ne permet pas dans certains cas de mesurer avec fiabilité sa durée car elle atténue les effets de l'arrêt respiratoire. La perte des réflexes de retrait et de redressement est également observée. Le temps de récupération varie de quelques secondes à quelques minutes suivant le type et la gravité de la lésion occasionnée.

Le réflexe de redressement est généralement utilisé pour mesurer la perte de conscience. Ceci consiste à placer l'animal en décubitus dorsal et à mesurer le temps pour se retourner sur ses pattes (Schmidt & Grady, 1993). Ce dernier paramètre semble en étroite corrélation avec la sévérité du TC. Ainsi, le rat met 2 à 4 min pour récupérer ce réflexe après un TC léger, 6 à 10 min (modéré) ou plus de 10 min pour le cas sévère (Ma et al., 2019). D'autres temps de suppression de réflexes peuvent évaluer l'état neurologique de l'animal tels que les stimulations du pavillon (la stimulation de l'oreille induit une secousse de la tête), de la cornée (clignement de l'œil suite à l'application d'un coton imbibé de sérum physiologique ou application d'une goutte de sérum sur la cornée) ou de la patte (contraction musculaire jusqu'au retrait par stimulation nociceptive) (Eakin et al., 2015). Les fonctions physiologiques comme les gaz du sang artériels, la fréquence cardiaque, la saturation en oxygène du sang, la pression intracrânienne et l'électrophysiologie peuvent aussi évaluer la gravité du TC.

L'utilisation d'une assistance ventilatoire avec une intubation et les méthodes d'anesthésie avec une analgésie influencent les paramètres utilisés pour déterminer la sévérité du TC (mortalité, arrêt respiratoire, réflexes de redressement, du pavillon de l'oreille et de la cornée) (Ma et al., 2019).

Dans le cadre de cette thèse, différents paramètres ont été utilisés, pour un suivi en continu jusqu'à une récupération quasi-totale, à l'aide de l'échelle de score de coma proposée par Pais-Roldan et al. (2019) et développée dans la partie « matériels et méthodes ».

IV.4.2. Evaluation de la sévérité en subaiguë – chronique

La perte de poids de l'animal après l'induction du TC peut être un indicateur de sévérité en le comparant au poids initial (pré-TC). De plus, ce paramètre est très largement utilisé dans le contrôle du bien-être animal général, quelque soit le modèle ou la sévérité. Eakin et al. (2015) ont observé une perte de 0-10 % pour le groupe léger, 15-20% pour les modérés et 25-30 % pour le groupe sévère. Une perte au-delà de 30 % est considérée comme un point limite, déclenchant la mise à mort pour limiter la souffrance de l'animal.

Le score de gravité neurologique (*neurological severity score*, NSS) est couramment utilisé pour évaluer la gravité des lésions cérébrales (modèles de TC et d'accident vasculaire cérébral) et reflète le degré de récupération spontanée ou induite lors d'essais de médicaments. Il est principalement utilisé tôt (une à deux heures après le TC jusqu'à plusieurs jours) dans les modèles de lâcher de poids (Flierl et al., 2009). Ce score estime de façon semi-quantitative le degré de déficit des réflexes et des fonctions somatosensorielles. Le NSS comporte différents paramètres tels que la perte de mouvement, la marche rectiligne, le réflexe de redressement, les réflexes oculaires, les réflexes des

membres, la marche sur une poutre et l'équilibre, le comportement exploratoire et la présence d'hémiplégie. Un des NSS proposé est noté sur 24 (zéro étant le score d'un animal sain et 24, le pire score possible), il augmente donc après le TC pour diminuer ensuite pendant la phase de récupération. Néanmoins, le NSS n'est pas approprié pour définir le TC léger et il ne s'applique que pour le TC modéré à sévère (Ma et al., 2019). Il existe des variantes du NSS avec l'inclusion d'autres items comme le sursaut suite à un bruit soudain, le réflexe de pincement de la patte, l'agrippement, la poussée latérale ou encore la présence de crises épileptiques. Le score total peut être également modifié et à l'inverse, un déficit post-TC peut amener à une soustraction des points totaux (Hausser et al., 2018; Shohami et al., 1995; Tupper & Wallace, 1980; Yarnell et al., 2016).

Un indicateur de sévérité sur le long terme concerne la présence **d'épilepsie post-traumatique**. Le modèle LFP est étudié dans ce cas de figure afin de comprendre les mécanismes sous-jacents de ce phénomène pathologique retrouvé chez l'Homme (Annegers et al., 1998). Toutefois, la présence de crises d'épilepsie nécessite une méthodologie adéquate pour les mesurer comme l'électroencéphalographie ou l'électrocorticographie couplée ou non à un enregistrement vidéo, afin de discriminer les crises non convulsives des crises myocloniques ou tonico-cloniques. Les études précliniques qui se sont penchées sur ce sujet ont montré que la présence d'épilepsie augmente avec la sévérité du TC induit dans le modèle (Kharatishvili et al., 2006). Cependant, les études utilisant le modèle LFP observant et évaluant les mécanismes lésionnels seulement du TC ne référencient pas la présence ou non de ces crises. Ce paramètre est donc seulement utilisé dans certaines recherches précliniques.

L'état général de l'animal après le TC, du point de vue bien-être (souffrance, inconfort, douleur et stress), est très peu abordé dans la littérature. Les travaux utilisant les modèles *in vivo* sont encadrés pour limiter et, en particulier, éviter ces états de mal-être en définissant des points limites de souffrance au-delà desquels l'animal doit être mis à mort. Dans le cadre du TC sévère, il est demandé de suivre les animaux quotidiennement à l'aide de grilles d'évaluation. Actuellement, cette approche est uniquement utilisée pour répondre aux obligations imposées par la réglementation encadrant la recherche animale (Directive Européenne 2013/63/UE, décret 2013-118 du 1^{er} février 2013 et la Charte Nationale). Pourtant, l'utilisation de ces résultats pourrait fournir des données scientifiques intéressantes et un outil supplémentaire d'évaluation de la sévérité du TC ainsi que de la récupération de l'animal. Il existe des grilles générales non spécifiques au TC. Pinkernell *et al.* (2016) ont proposé une grille de score chez le rongeur ayant des lésions traumatiques et/ou des hémorragies sous-arachnoïdiennes de gravité modérée. Différents paramètres sont inclus dans cette grille tels que le poids, les douleurs dues aux maux de tête ou à la chirurgie, l'infection de la plaie, l'immobilité, l'état de mal épileptique, le coma ou encore la paralysie complète. Comme toute grille de suivi, le score final

et certains items amènent à la mise à mort de l'animal (point limite). Le fait intéressant dans cette grille, est l'appréciation de l'état général de l'animal à la suite d'une lésion cérébrale et le temps de récupération vers un état physiologique stable, qui pourrait varier suivant la gravité du TC appliquée.

IV.4.3. Les déficits neurocomportementaux sur le long terme

De nombreuses études *in vivo* sur le TC induit par le dispositif LFP se sont focalisées sur les effets post-TC pendant les périodes précoces, de quelques jours à un mois. Pourtant le TC sévère est une pathologie chronique et donc évolutive, nécessitant un regard sur du long terme. À ce jour, peu de recherches ont été menées dans ce sens. Les moyens employés pour mesurer les lésions et les déficits sur une longue période se tournent vers l'électrophysiologie (principalement les recherches sur l'épilepsie post-traumatique) ; l'imagerie, notamment l'histologie, l'IRM ou encore la tomographie par émission de positons ; mais aussi les tests comportementaux évaluant la motricité, la sensibilité, la cognition (apprentissage et mémoire), les états émotionnel et social (anxiété, dépression) (Kabadi & Byrnes, 2020).

IV.4.3.a. Épilepsie

Le modèle LFP dans la recherche sur l'épilepsie post-traumatiques (PTE) et l'épileptogénèse nécessite généralement un TC de haute gravité. En effet il existe un corrélat entre la gravité du TC et de l'épilepsie en clinique humaine (Annegers et al., 1998). Kharatishvili *et al.* (2006) ont mesuré et enregistré des PTE chez 43 à 50 % des animaux traumatisés sévères dont le début d'expression de l'épilepsie était déclarée entre 7 semaines et un an. Leurs critères de sévérité reposaient sur une pression atmosphérique induite de 2,6 à 3 atm et sur un taux de mortalité élevé de 33 %. Ils ont également précisé l'intégrité préservée de la dure-mère après le TC, qui est un paramètre important du modèle LFP. Cet élément n'est pas, ou peu décrit. Sick *et al.* (2017) ont observé l'expression des décharges épileptiformes corticales dans ce modèle LFP chez les rats traumatisés réparties dans 3 catégories uniquement sur le critère de la pression induite : TC léger à 1,2-1,5 atm ; TC modéré à 1,8-2,2 atm et TC sévère à 2,4-3,0 atm. Les auteurs ont relevé une augmentation de ces décharges épileptiformes après la blessure mécanique, mais indépendamment de la gravité du TC. Cependant, une autre étude n'a pas observé dans leur cohorte d'animaux (TC sévère sur le critère de la pression : 3,4 atm) de telles décharges épileptiformes ou de crises d'épilepsie convulsives durant l'année post-TC (Rodgers et al., 2015). Cette absence de différence suivant la sévérité du TC peut être causée par le choix unique du critère de gravité du TC (la pression induite). Alors, les animaux ne seraient pas conformément regroupés, ne reflétant pas correctement un TC sévère.

IV.4.3.b. *Comportements post-traumatiques et imagerie*

Des études ont constaté des séquelles comportementales au-delà d'un mois. Pierce *et al.* (1998) ont observé la présence de déficits dans la tâche d'apprentissage spatial avec le test du labyrinthe aquatique (*Morris Water Maze*, MWM) dès un mois et jusqu'à un an après la blessure mécanisme par LFP. Toutefois, cette capacité à acquérir de nouvelles informations après un TC observée par la rétention spatiale a seulement montré une tendance non significative. Ce qui est surprenant car les animaux n'avaient pas appris la tâche d'apprentissage spatial. De plus, les rats traumatisés sévères présentaient des troubles moteurs (flexion membre antérieur) persistant jusqu'à un an. La gravité du TC a été définie par une pression de 2,7 à 3,1 atm et une mortalité de 43 %. Hausser *et al.* (2018) ont mesuré des déficits de la marche avec le test de la poutre jusqu'à 3 mois après le TC mais ils n'étaient pas détectables au-delà. Ils ont également observé des pertes d'équilibre à l'aide du test de la poutre et du score neurologique jusqu'à six mois et des déficits de la mémoire de travail par le MWM jusqu'à un an. Toutefois, l'induction du TC a été réalisée à une gravité modérée sans définir les paramètres. L'étude de Jones *et al.* (2008) a montré un phénotype anxieux chez les animaux traumatisés à un, trois et six mois après le TC avec le test de l'*open-field*, le *elevated plus maze* mais pas dans le test de la nage forcée, ni dans le test de préférence aux saccharoses. La pression induite du TC sévère chez les rats était de 3,5 atm.

L'évaluation post-TC a aussi été observée par imagerie pour mesurer les lésions cérébrales ainsi que des perturbations du métabolisme. Liu *et al.* (2010) ont mesuré à l'aide de la tomographie par émission de positons un hypométabolisme généralisé en particulier dans le cortex ipsilatéral, l'hippocampe et l'amygdale, présent à une semaine et devenant plus important à un mois, puis d'une diminution au cours du temps. De plus, ils ont observé une atrophie progressive du volume cérébral et en particulier de l'hippocampe sur six mois. Les auteurs ont seulement indiqué que le TC induit était d'une pression sévère de 3,2 à 3,5 atm sans l'utilisation d'autres paramètres. Immonen *et al.* (2009) ont réalisé un suivi par IRM quantitatif de l'atrophie et des changements structuraux de l'hippocampe ipsilatéral en phase subaiguë jusqu'à 23 jours chez le rat. Les animaux présentaient des déficits et des changements précoces de l'hippocampe qui pourraient prédire un résultat à long terme après un TC. Les auteurs ont déduit que les modifications de l'hippocampe en phase précoce étaient corrélées aux résultats structuraux et fonctionnels (MWM) mesurés à 6 et 12 mois après le TC. Ils ont défini la sévérité sur la base de la pression induite de 2,6-3,3 atm et du taux de mortalité de 25 %.

Les différentes études menées sur le suivi longitudinal des séquelles post-TC dans le modèle LFP suggèrent des déficits et des lésions sur le long terme. Toutefois, certaines études n'ont pas précisé si la dure-mère était intacte après l'induction du TC. De plus, les auteurs utilisent des critères

d'inclusion et définissent la gravité de leur modèle avec, parfois, un seul ou plusieurs paramètres qui ne sont pas identiques d'une étude à une autre.

IV.4.4. Représentation des sexes dans les études menées

Le TC a longtemps été considéré comme une pathologie masculine dû à une plus faible prévalence chez la femme. Ainsi, une plus grande proportion d'études s'est penchée sur l'homme (les mâles pour les études précliniques) tout en ignorant la variable liée au sexe, que ce soit en recherche clinique ou expérimentale. Pourtant à partir de 60 ans, la prévalence du TC n'est plus différente entre les hommes et les femmes (James et al., 2019). Cette propension à analyser uniquement le sexe masculin aboutit à négliger l'effet du sexe, et peut conduire à des conséquences graves, notamment dans les essais thérapeutiques où l'effet des médicaments peut différer en fonction du sexe. En effet, aucune thérapie efficace n'existe pour le TC et de nombreux essais précliniques prometteurs n'ont pas été efficaces lors des essais chez l'humain. Cela peut être dû en partie au faible nombre d'études précliniques qui incluent la variable sexe. De plus, peu de femmes sont recrutées dans les essais cliniques (Gupte et al., 2019). Les données actuelles mesurant les variabilités potentielles liées au sexe ne montrent aucun consensus que ce soit en clinique ou en expérimentation animale. En effet, certaines études aboutissent à un plus mauvais pronostic après TC pour la femme, d'autres pour l'homme, et d'autres études ne détectent pas de différence (Spani et al., 2018). Dans les études cliniques, 47 % ont rapporté des déficits plus importants chez les femmes et seulement 26 % pour les hommes, pour toutes les gravités du TC confondues. Concernant le TC sévère, 34 % constatent que les femmes ont une moins bonne évolution que les hommes et 64 % montrent l'inverse. Cette tendance existe également dans les expériences *in vivo* chez l'animal avec un taux de 55 % d'études rapportant un meilleur pronostic pour les femelles avec un TC léger-moderé que les mâles et seulement 10 % un plus mauvais pronostic. Néanmoins, 35 % des études n'ont pas détecté de différences. Dans le cas du TC induit par le LFP, Gupte *et al.* (2019) ont recensé seulement cinq études traitant la variable sexe. À l'inverse des précédentes données, la tendance était à un moins bon pronostic pour les femelles dans 60 % des études *versus* 40 % décrivant pour une meilleure récupération chez les femelles. Il est évident que des variations existent entre les sexes au niveau des hormones sexuelles, de l'inflammation, du comportement (Gupte et al., 2019; Rubin & Lipton, 2019; Spani et al., 2018). Cependant, il est difficile de conclure au vu de l'hétérogénéité des données.

OBJECTIFS

Objectifs

Le traumatisme crânien est l'une des causes majeures d'handicap et de mortalité dans le monde. Il peut être stratifié en plusieurs niveaux de gravité : léger, modéré ou sévère. Le TC sévère apparaît comme une pathologie spécifique susceptible de recruter des mécanismes lésionnels propres comme les dépolarisations corticales envahissantes, le vasospasme ou l'œdème cérébral, et d'induire des déficits fonctionnels distincts comme le handicap moteur ou l'épilepsie. Le TC sévère est donc une pathologie distincte dont l'étude demande la mise au point de modèles spécifiques : il n'est pas possible de comprendre le TC sévère en extrapolant les données obtenues avec des TC légers ou modérés.

Divers modèles de TC *in vitro* et *in vivo* ont été développés afin de comprendre et d'évaluer les modifications moléculaires, biochimiques, cellulaires et comportementales mises en jeu dans cette pathologie. Parce que le TC sévère impacte l'ensemble de l'organisme, par exemple les agressions cérébrales d'origine systémique, les fonctions respiratoires, cardio-vasculaires ou immunitaires qui ne peuvent pas être reproduites *in vitro*, les modèles d'étude de cette pathologie nécessitent l'utilisation d'animaux vivants. De plus, l'évolution temporelle des lésions sur plusieurs mois ne peut être considérée que par l'étude *in vivo*. Dans les modèles animaux actuels de TC sévère, la notion de gravité n'est encore correctement définie : la transition entre le TC modéré et sévère est mal documentée et les modèles de TC sévère contrôlent peu la coexistence avec d'autres morbidités comme les hémorragies méningées, les déchirures de la dure-mère ou l'existence de hernies cérébrales.

L'objectif de ce travail de thèse est de caractériser un modèle de TC sévère chez le rat d'un point de vue comportemental mais aussi par l'imagerie, tant chez les mâles que chez les femelles. Pour cela, nous nous sommes tournés vers le modèle de percussion latérale de fluide et avons précisé les critères permettant d'évaluer la sévérité du TC et de distinguer le plus objectivement possible les TC sévères des TC légers-modérés.

Dans un premier temps, nous nous sommes penchés sur la mise en place du TC sévère chez l'animal en utilisant une valve pneumatique. Cette approche visait à palier certains inconvénients du modèle LFP conventionnel comme sa maniabilité et sa reproductibilité. Cette étude s'est réalisée dans un protocole sans réveil et évaluant la gravité du modèle par le temps d'arrêt respiratoire, le taux de mortalité et l'apparition spontanée de dépolarisation corticale envahissante.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux difficultés éthiques liées à la modélisation du TC sévère chez l'animal. Cette pathologie est à juste titre classée parmi les procédures sévères et nécessite un examen prospectif et rétrospectif des projets ainsi qu'une évaluation du bien-

être animal au cours des expérimentations. Pour cela, nous avons élaboré une grille de score afin de quantifier le bien-être animal tout au long de la période expérimentale.

Enfin, nous avons caractérisé le modèle de TC sévère élaboré au cours de cette thèse par une observation longitudinale. Une première étude s'est portée sur les différences anatomiques observées jusqu'à deux mois après le TC sévère par IRM. Puis, nous avons analysés les déficits comportementaux (motricité, cognition et, anxiété) jusqu'à 5,5 mois après la blessure initiale.

MATERIELS ET METHODES GENERALS

I. Etudes menées

Les travaux présentés dans cette thèse sont divisés en trois études. La première consiste à raffiner le modèle d'induction du traumatisme crânien qui s'est déroulé sur les six premières heures après le TC. La deuxième établit une grille de score pour quantifier et suivre le bien-être des animaux après le TC sévère, ceci sur 160 jours. Enfin, la dernière étude vise à caractériser le modèle de traumatisme crânien sévère chez le rat en longitudinale grâce à des tests comportementaux et d'un suivi par imagerie des lésions secondaires sur 160 jours (**Figure 33**).

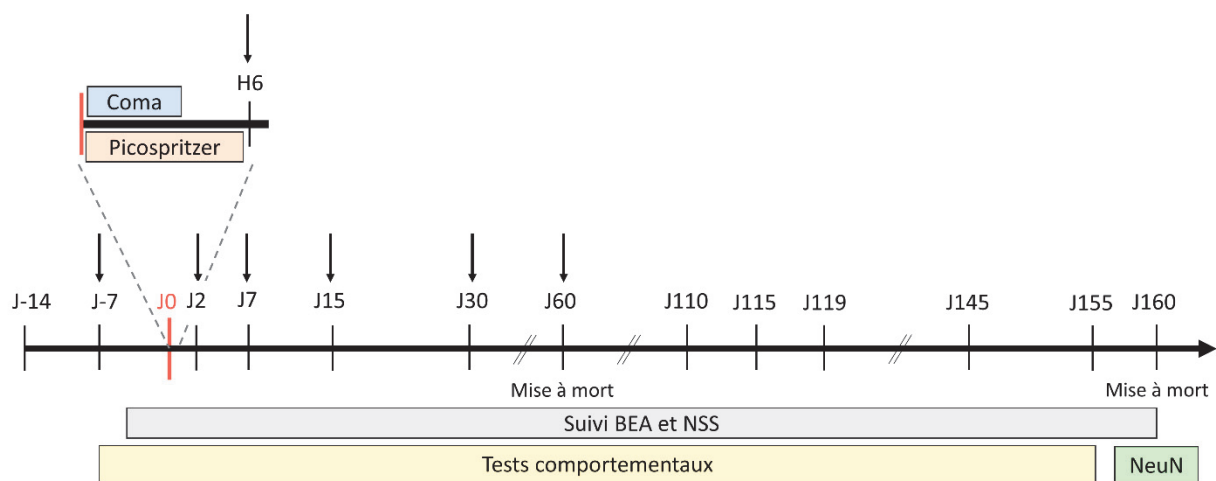


Figure 33. Protocole du déroulement des études sur la caractérisation du traumatisme crânien sévère chez le rat. La première étude s'est déroulée sur les six heures après TC (valve pneumatique, Picospritzer). La deuxième concerne le bien-être animal (suivi BEA, 160 jours après le traumatisme crânien). Enfin, la dernière étude concernait l'évolution longitudinale des lésions post-traumatiques par des tests comportementaux, de l'imagerie par résonance magnétique (IRM, flèche noire verticale) et de l'histologie pour observer les neurones (NeuN) sur 160 jours. NSS : score de sévérité neurologique.

II. Les animaux

Les animaux utilisés étaient des rats mâles et femelles de souche Sprague-Dawley provenant de ENVIGO (Gannat, France) pour les études liées à la mise en place de la valve pneumatique, au bien-être animal, aux comportements, et de Charles River (Saint-germain-Nuelles, France) pour celle de l'IRM. Les protocoles ont été approuvés par le comité d'éthique régional (APAFIS#10019 et

APAFIS#10044) et réalisés conformément à la directive européenne 2010/63/UE. Les expérimentations se sont déroulées au sein de la zone d'expérimentation animale du Neurocampus M. Jouvét au Centre de recherches en Neurosciences de Lyon (CRNL, autorisation DDA69675-01) et de la plateforme d'imagerie biologique et médicale dans le département Animage du CERMEP (autorisation B693830501). L'âge et le poids des animaux sont décrits dans les parties résultats. Les rats étaient stabulés entre 2 à 5 par cages et étaient maintenus en cycle de 12 h d'éclairage (7 h - 19 h) avec une température de 22 ± 2 °C et d'une hygrométrie de 50 ± 5 %, au sein des animaleries agréées du Neurocampus au CRNL et du CERMEP. Tout au long des protocoles, les rats ont eu accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*. La cage des animaux était enrichie avec un bâton en peuplier, des lanières frisées de papier (*sizzle-nest*), de papier absorbant et, pour les animaux maintenus dans l'animalerie du CERMEP, d'un tunnel. À leurs arrivés, les rats ont eu une semaine d'acclimatation. La manipulation et la préhension des animaux étaient réalisés 5 min par jour lors de la semaine antérieure à celle du début de l'expérimentation. Pour les tests de comportement, les animaux étaient placés au moins 30 min avant l'expérience dans la pièce dédiée pour diminuer le stress induit par le nouvel environnement.

III. Protocole chirurgical

La chirurgie préparatoire à l'induction du TC a été réalisée comme décrite par Eakin *et al.* (2015) avec des modifications prenant en compte la sévérité du modèle.

L'animal était anesthésié par inhalation d'isoflurane à 5 % avec un mélange de 30 % de dioxygène et de 70 % d'air, et est maintenu à 1,5 - 2,5 % d'isoflurane tout au long de la chirurgie. Le rat était ensuite placé sur une couverture chauffante (LSI Letica, Barcelone, Espagne) reliée à une sonde rectale pour maintenir sa température corporelle à 37°C au cours de l'intervention chirurgicale. Le rat a reçu 25 min avant la chirurgie une infiltration d'un agent analgésique, la buprénorphine (Buprécare®, Axience, Pantin, France), en sous-cutanée (SC) entre les omoplates. Des études antérieures ont montré un réveil difficile de l'animal avec une concentration de 0,05 - 0,1 mg/kg de cette molécule. Pour la suite du projet de thèse, nous avons décidé d'utiliser une concentration de 0,02 mg/kg. Suivant la méthode de Jou *et al.* (2000), l'animal était intubé avec une sonde endotrachéale de 14 ou 16 G, suivant le poids de l'animal, recouvert sur la face externe d'une fine couche de pramocaïne (Thronothane, Biocodex, Gentilly, France), un analgésique local afin de limiter l'irritation de la trachée. Une injection de bromure de glycopyrronium (SC, 0,1 mg/kg, Robinul-V, Centravet, Lapalisse, France) était effectuée au niveau du flanc 15 min avant l'intubation. Cette molécule est un anticholinergique muscarinique qui bloque le système parasympathique et diminue les sécrétions gastriques, salivaires et intestinales, et donc, limite l'obstruction de la sonde

endotrachéale. L'animal était ensuite placé sous ventilation assistée (Ispra MA1 55-7058, Harvard ApparatusR, Edenbridge, UK ; volume courant de 6 mL/kg, fréquence respiratoire de 60 bpm, pression expiratoire positive de 5 cm H₂O) et sa tête était positionnée dans un cadre stéréotaxique. Afin de limiter l'assèchement buccal, un morceau de compresse imbibé de sérum physiologique a été placé sur la langue et réhydraté tout au long de la chirurgie. Le crâne du rat était rasé, puis la peau était nettoyée avec une solution antiseptique (Vétédine). Une anesthésie locale est réalisée par l'injection d'un mélange de lidocaïne (5 mg/mL, Xylovet®, Ceva) et de ropivacaïne (3,75 mg/mL, AstraZeneca LP) au site de l'incision (SC, 0,1 mL/100 g) et au niveau des oreilles (0,05 mL) 10 min avant l'acte chirurgical. L'incision cutanée a été pratiquée en suivant la ligne médiane du crâne, en arrière des yeux jusqu'à l'avant des oreilles. Ensuite, les muscles et le périoste ont été écartés afin d'exposer la surface de l'os. Les yeux et la langue ont été hydratés régulièrement à l'aide d'Ocry-gel. Une craniotomie (-3,8 mm en antéropostérieur et de 3 mm en latéral droit) a été pratiquée à l'aide d'une trépine de 4 mm de diamètre pour marquer l'os, puis d'une fraise à tête ronde de 0,6 mm de diamètre pour l'affiner (**Figure 34.A**). Durant la trépanation, l'os était humidifié continuellement avec du sérum physiologique pour limiter l'échauffement provoqué par les vibrations lors de la trépanation et une attention particulière a été portée afin d'éviter et de repérer les lésions de la dure-mère. La peau était ensuite protégée par des compresses imbibées de sérum physiologique, et un embout Luer lock d'une aiguille de 5 mm de diamètre externe était apposé sur le site de la craniotomie avec de la colle cyanoacrylate, puis et sécurisé avec de l'acrylique dentaire (Paladur, Heraeus Medical, Courtaboeuf, France). L'embout, formant ainsi un support d'ancrage, était également rempli de sérum physiologique (**Figure 34.B**). Enfin, le capteur de pression artérielle fixé à l'embout Luer lock était relié à l'appareil d'induction du TC par une tubulure en polyuréthane (100 cm de long et d'un diamètre interne de 2,50 mm, modèle TU0425, SMC). Avant l'induction du TC, l'animal était retiré du respirateur artificiel afin de retrouver une respiration spontanée. Une arrivée d'oxygène avec l'arrêt d'inhalation d'isoflurane était placée proche du museau de l'animal et le rat a reçu quelques gouttes de doxapram hydrochloride (Dopram-V, Centravet, Lapalisse, France) sur la langue et le museau pour prévenir des complications respiratoires liées au TC. Le TC était administré dès les premiers signes d'une contraction musculaire des membres postérieurs suite à un léger pincement des orteils. Cette sédation moins profonde limite les complications du TC, notamment la durée de l'arrêt respiratoire.

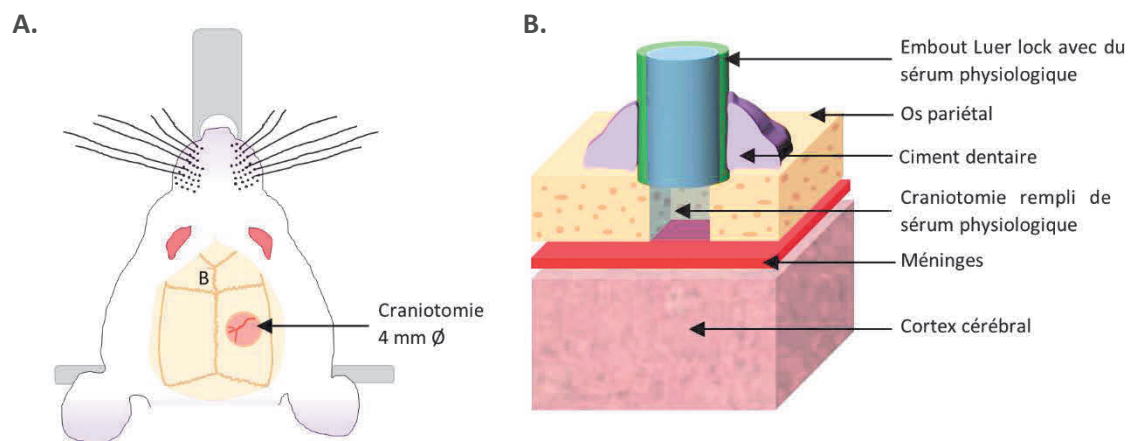


Figure 34. Illustrations de la zone d'induction du traumatisme crânien. A. Localisation de la zone trépanée à -3,8 mm en antéropostérieur et de 3 mm en latéral à partir du Bregma (B). B. Vue latérale de la craniotomie avec l'embout Luer lock rempli de sérum physiologique qui est encastré dans l'acrylique dentaire au site de la trépanation.

IV. Induction du traumatisme crânien sévère

Le TC était induit par le dispositif à percussion latéral de fluide (LFP). Le maillet était lâché depuis un angle déterminant l'intensité délivrée (entre 25° et 28°). Lorsque celui-ci frappe le piston de la colonne d'eau (réservoir cylindrique, 60 cm de long et 8 cm de diamètre), une faible quantité d'eau est éjectée dans l'espace épidural. De ce fait, le piston ne revient pas à sa place initiale, provoquant une surpression dans le réservoir. L'ouverture du robinet présent sur la colonne d'eau permet d'éliminer cette surpression avant chaque lâcher du maillet. Habituellement, le rat est directement connecté en sortie du réservoir afin de recevoir le TC. Nous avons ajouté une tubulure remplie de sérum physiologique pour éviter le déplacement de l'animal (Figure 35). Le transducteur de l'appareil LFP était relié à un oscilloscope et au logiciel LabChart (version 8, ADInstrument, Oxford, Royaume-Uni) pour enregistrer et contrôler les ondes de choc. Une attention particulière a été portée sur l'intégrité de la dure-mère et la présence de déchirure de celle-ci. Si une lésion est observée, l'animal était mis à mort par une injection létale de pentobarbital sodique (100 mg/kg, IP, Euthasol, Centravet). En effet, la préservation d'une dure-mère intacte est un critère important pour ce modèle. Comme décrit dans la partie IV de l'introduction, une déchirure de celle-ci ne permet plus de considérer le modèle de TC comme non pénétrant.

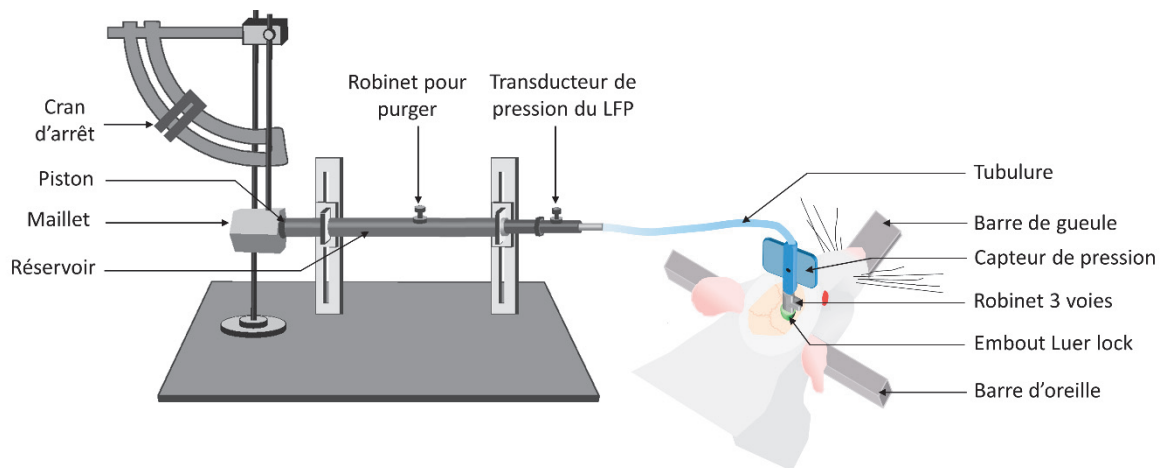


Figure 35. Représentation schématique du dispositif de percussion latérale de fluide (LFP). Un maillet est lâché d'un angle et d'une hauteur déterminés par le cran d'arrêt sur une colonne d'eau (réservoir) et l'onde de choc est transmise jusqu'à la dure-mère en passant par la tubulure puis par le capteur de pression artérielle (rempli de sérum physiologique). Un faible volume de fluide va s'infiltrer dans l'espace extradural pour induire une déformation du tissu cérébral. L'animal reste ainsi positionné dans le cadre stéréotaxique. Le robinet du réservoir permet d'éliminer les bulles d'air et de remplir la colonne. Les capteurs de pression (transducteur du LFP et pression artérielle) sont reliés à une carte d'acquisition pour être lus par le logiciel LabChart. Illustration modifiée provenant de (Ziebell et al., 2012).

Avant l'utilisation du dispositif, le piston est coulissé manuellement, puis avec le fluide contenu dans le réservoir afin de le desserrer et de le lubrifier. Les calibrations de l'appareil sont réalisées en circuit fermé via un robinet au niveau du capteur de PA. Dix ondes de choc sont réalisées pour les calibrations avant et après TC afin de s'assurer de la pression voulue et qu'aucune bulle ne soit introduite dans le dispositif au niveau de la colonne d'eau, de la tubulure et du capteur de PA. Lorsque des bulles d'air sont présentes dans le dispositif, l'onde de choc présente des oscillations à haute fréquence, probablement liées à la relaxation des bulles (**Figure 36**).

Des points limites ont été établis lors de la chirurgie. Une lésion de la dure-mère avant ou après l'induction du TC et avec ou sans hernie cérébrale, et/ou une défaillance respiratoire de plus de 45 min amènent à la mise à mort de l'animal. Pour cela, l'animal sous anesthésie et analgésie reçoit une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (100 mg/kg, Euthasol, Centravet).

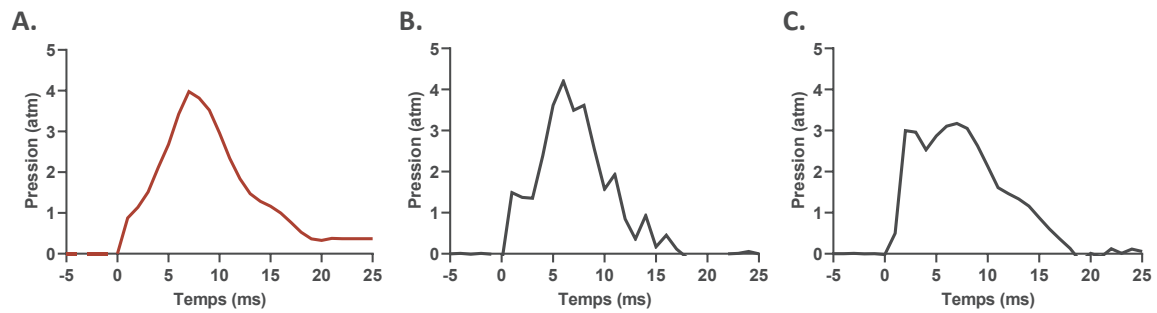


Figure 36. Profils d'ondes de choc produites à 3,8 atm par l'appareil à percussion latérale de fluide et mesurées par le transducteur. A. Onde de choc sans présence de bulles d'air au sein du dispositif. Les bulles induisent des oscillations altérant la pression et le profil de l'onde soit en dents de scies (B), soit en amoindrissant et en doublant la pression maximale (C).

V. Choix du groupe contrôle

Il est important de choisir correctement les animaux contrôles afin de comparer et d'observer les lésions suite à un TC sévère. Pour cela, nous pouvons utiliser des rats naïfs, ne subissant aucune chirurgie, ou des rats sham qui auront la même préparation et les mêmes actes chirurgicaux que les animaux de l'expérience, c'est-à-dire avec un TC. Cole *et al.* (2010) ont observé les différences pour deux groupes sham dont la craniotomie a été réalisée par une trépine manuelle ou par une fraise électrique et d'un groupe naïf. Ils ont relevé chez les animaux trépanés des lésions corticales, une réponse inflammatoire dans cette région et une variation comportementale sur la base du score neurologique de sévérité. Ces diverses altérations peuvent provenir (1) du volet osseux retiré qui peut perturber les fibres nerveuses et la vascularisation cérébrale superficielle, (2) de l'exposition temporaire du parenchyme à l'atmosphère ambiante, ou encore (3) de l'action mécanique de la trépanation. Les rats traumatisés subissent une craniotomie et sont donc susceptibles à ces lésions qui ne sont pas de nature traumatique et doivent donc être éliminées de nos comparaisons statistiques. Pour écarter l'effet de la chirurgie chez les groupes TC sévères, nous avons donc décidé d'utiliser des animaux sham.

Ainsi, les rats sham ont eu une procédure chirurgicale identique mais n'ont pas reçu le TC. Après la craniotomie, le pan cutané a été nettoyé avec du sérum physiologique puis des points de sutures simples ont été réalisés pour refermer l'incision. L'animal a reçu une injection en sous-cutanée de sérum physiologique (2,5 mL) au niveau des flancs pour limiter la déshydratation.

VI. Suivi des paramètres vitaux lors de la chirurgie

Il est important d'encadrer un suivi des paramètres vitaux des animaux dès le début de l'anesthésie jusqu'au réveil total, pour limiter les perturbations physiologiques pouvant s'ajouter aux risques liés à la chirurgie et au TC. Comme écrit dans la partie « protocole chirurgical », la température de l'animal était régulée par un tapis chauffant relié à une sonde rectale afin d'éviter l'hypothermie due à l'anesthésie. Les fréquences cardiaques et respiratoires ont été observées en continu par un ou deux (dans le cas des chirurgies réalisées en parallèle) systèmes non invasifs. Ces systèmes de mesure assurent une surveillance pour ajuster le niveau d'anesthésie mais surtout pour contrôler la reprise de la respiration spontanée après l'induction du TC.

- Le DECRO, un gilet télémétrique qui mesure les variations de volume du thorax combiné à deux électrodes cardiaques placées sur les flancs de l'animal pour enregistrer l'électrocardiogramme et récupérer la fréquence cardiaque (**Figure 37.A**, Etisense, Lyon, France). Les paramètres sont envoyés par Bluetooth par un émetteur vers un serveur d'acquisition et enregistrés par le logiciel fourni avec le dispositif.
- L'oxymètre de pouls évalue l'effort respiratoire et la capacité d'absorption des infrarouges par l'hémoglobines du sang (620 à 950 nm) suivant son taux de saturation en oxygène (**Figure 37.B**, MouseOx Plus, STARR Life Sciences Corp., Oakmont, PA, USA). De plus, la saturation en oxygène (SatO₂) est mesurée et contrôlée. Pour les animaux montrant une forte désaturation en oxygène, la fraction inspirée d'oxygène est augmentée de 30 ou 40 %. Cet appareil est relié à une carte d'acquisition (PowerLab, ADInstrument, Oxford, Royaume-Uni) pour enregistrer les données de saturation ainsi que les fréquences cardiaque et respiratoire avec le logiciel LabChart (version 8, ADInstrument).

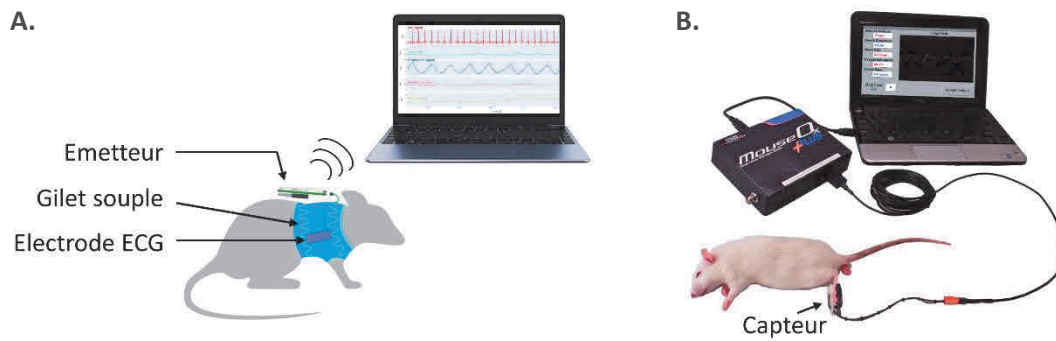


Figure 37. Systèmes de mesures non-invasifs des paramètres vitaux. A. Le dispositif DECRO est constitué gilet télémetrique pour la fréquence respiratoire et de deux électrodes cardiaques (ECG, électrocardiogramme) positionnées sur les flancs de l'animal. B. L'appareillage du MouseOx est un oxymètre de pouls mesurant les fréquences cardiaque et respiratoire, ainsi que la saturation en oxygène. Une pince constituée du capteur est positionnée sur une patte postérieure de l'animal. D'après <https://etisense.com/> et <https://sdr.com.au/portfolio-items/mouseox/>.

VII. Contrôle de la sévérité du modèle

VII.1. Etude sans réveil

L'étude portant sur le raffinement du modèle concerne un protocole sans réveil. Dans ces conditions, il est difficile de contrôler avec exactitude la sévérité du TC car les animaux sont anesthésiés. Les paramètres utilisés sont donc la pression atmosphérique maximale de l'onde de choc, le temps d'arrêt respiratoire déterminé par l'arrêt de la ventilation artificielle de 10 s toutes les 5 minutes et l'apparition spontanée de dépolarisations corticales envahissantes (DCE) observées majoritairement après un TC sévère. L'enregistrement des DCE est développé dans la première étude des résultats.

VII.2. Etudes avec réveil

VII.2.1. Échelle de coma chez le rat de Tübingen-Boston

En plus de la pression maximale de l'onde de choc et du temps de l'arrêt respiratoire, une échelle de coma pour rat développée initialement par Pais-Roldan *et al.* (2019) a été utilisée afin de contrôler le niveau de conscience des animaux (**Tableau VII**). Cette méthode peut s'apparenter à l'échelle de Glasgow utilisée chez l'homme pour définir l'état de conscience et donc du degré de sévérité du TC. Nous l'avons utilisé afin d'établir le niveau de gravité du TC induit avec le LFP, mais aussi le temps de récupération. Elle est divisée en plusieurs paramètres impliquant des

comportements réflexes du rat et une notation est donnée en fonction des réponses aux stimuli ou de l'état spontané de l'animal :

- **Clignement des yeux** : le clignement spontané des yeux est observable entre quelques secondes à 3 min chez l'animal non anesthésié. L'évaluation consiste à stimuler doucement une partie du corps de l'animal (sans toucher l'œil), par exemple le pavillon de l'oreille, et la réponse est positive si l'animal cligne au moins d'un œil.
- **Fonction motrice** : sans mouvement spontané, la réponse nociceptive est observée à la suite d'un pincement de la patte (retrait du membre en condition physiologique).
- **Réflexes du tronc cérébral** : La contraction pupillaire est observée à la loupe binoculaire (ou à l'œil nu). L'œil est soumis à différentes intensités lumineuses. Le réflexe est présent lorsque le diamètre de la pupille diminue en présence d'une intensification lumineuse. Le réflexe de la cornée est observé en appliquant une goutte de sérum physiologique délicatement sur l'œil (ou en approchant un coton-tige imbibé de sérum physiologique sur l'épithélium cornéen) ce qui induit, en condition physiologique, un clignement palpébral. La stimulation du pavillon de l'oreille est réalisée grâce à une tige avec un embout arrondi en touchant/chatouillant doucement l'oreille. L'animal contracte ou bouge la tête lors d'une réponse positive.
- **Respiration** : évaluation de la respiration spontanée de l'animal.
- **Réflexe de redressement** : l'animal est positionné en décubitus dorsal. Le réflexe est partiellement présent si l'animal est capable de se contorsionner ou de s'orienter (mouvement musculaire de la tête, du tronc, des membres et de la queue). Un repositionnement complet (retour sur ses pattes/décubitus ventral) représente un retour complet du réflexe.
- **Réponse auditive** : le réflexe est présent si l'animal réagit suite au son induit par un claquement de doigt (sursaut, mouvement du corps ou tremblement).
- **Mouvement des vibrisses** : les vibrisses sont la fonction sensorielle la plus développée chez les rongeurs et sont en constant mouvement dans des conditions d'éveil physiologique. L'observation se fait par la stimulation des vibrisses à l'aide d'une tige par des mouvements rectilignes, perpendiculaires à l'implantation des vibrisses, si elles ne bougent pas spontanément.

Concernant les réflexes pouvant être testés des deux côtés (les yeux, les oreilles, les vibrisses ou les membres), le score (présent/partiel/absent) était considéré comme présent si la réponse était observée au moins d'un côté. Le décompte temporel démarrait au moment de l'induction du TC, puis la grille était remplie toutes les 5 minutes jusqu'à la reprise de conscience (état d'éveil) de l'animal. Un score final de 0 reflétait un état comateux avec la perte des réflexes du tronc cérébral, de la fonction motrice et d'un arrêt respiratoire tandis qu'un score maximal de 16 présentait un état de conscience

complet (physiologique). À partir d'un score de 13, l'animal était considéré comme éveillé. Ce score était basé sur la moyenne des groupes sham qui ne présentaient pas tous les paramètres d'état de conscience complet mais étaient mobiles (marche spontanée). Tout au long de cette évaluation, le rat était positionné soit sur un tapis chauffant, soit sous une lampe chauffante afin de maintenir une température corporelle proche de 37 °C pour éviter l'hypothermie. De plus, les animaux tardant à récupérer recevaient une injection en sous-cutanée de sérum physiologique régulièrement (30 min).

Tableau VII. Échelle de coma pour rat de Tübingen-Boston. Cette grille reflète l'état de conscience de l'animal par une activité spontanée ou suite à un stimulus. D'après (Pais-Roldan et al., 2019).

- [1] Le clignement spontané de l'œil varie entre quelques secondes à 3 min.
- [2] Le clignement d'au moins un œil suite à une stimulation d'une partie du corps de l'animal (sauf l'œil).
- [3] La stimulation est réalisée par un pincement de la patte.
- [4] La stimulation est réalisée par une variation de l'intensité lumineuse.
- [5] Le réflexe est présent si un clignement de l'œil est observé suite à l'application d'une goutte de sérum physiologique.
- [6] Une tige à bout émoussé est utilisée pour stimuler le pavillon de l'oreille. Le réflexe est positif si l'animal remue les oreilles ou la tête.
- [7] Le réflexe de redressement est observé en positionnant l'animal en décubitus dorsal.
- [8] La réaction est observée suite à un bruit.
- [9] Les vibrisses sont stimulées à l'aide d'une tige (mouvement horizontal) et une réponse est considérée positive si les vibrisses bougent spontanément ou suite à la stimulation.

ECHELLE DE COMA POUR RAT		Date/heure :		Rat/groupe :				
Paramètres	Temps post-chirurgie (min)							
CLIGNEMENT DES YEUX								
2 - Clignement spontané ¹								
1 - Clignement lors de la stimulation ²								
0 - Pas de clignement (sans toucher l'œil)								
FONCTION MOTRICE ³								
4 - Marche volontaire								
3 - Mouvements spontané isolé (ex. membres ou tête)								
2 - Retrait de la patte suite stimulus nociceptif								
1 - Contraction musculaire suite stimulus nociceptif								
0 - Absence de réponse suite stimulus nociceptif								
REFLEXES DU TRONC CEREBRAL								
3 - Pupille ⁴ + cornée ⁵ + pavillon de l'oreille ⁶								
2 - Deux réflexes présents : pupille/ cornée/ pavillon de l'oreille								
1 - Pupille ou cornée ou pavillon de l'oreille								
0 - Absence de réflexe								
RESPIRATION								
3 - Non intubé, respiration régulière								
2 - Non intubé, respiration irrégulière								
1 - Respiration au-dessus de la fréquence du respirateur artificiel (ventilation spontané)								
0 - Respiration à la fréquence du respirateur artificiel ou arrêt respiratoire (ventilation non spontané)								
REFLEXE DE REDRESSEMENT								
2 - Normal ⁷								
1 - Partiel								
0 - Absent								
REPOSE AUDITIVE								
1 - Sursaut auditif ⁸								
0 - Absent								
MOUVEMENTS DES VIBRISSES								
1 - Mouvements spontanés des vibrisses ⁹								
0 - Absent								
TOTAL /16								
Remarques								

VII.2.2. Score de gravité neurologique

La grille de score de gravité neurologique a été adaptée à partir de celles proposées par Beni-Adani *et al.* (2001) et Hausser *et al.* (2018) . Cette grille évalue des réflexes sur 12 items notés de 0 à 2 (0 : aucun déficit, 1 : déficit mineur, 2 : déficit majeur) donnant un score global sur 24. Un score élevé signifie que l'animal présentait des déficits sévères (**Tableau VIII**).

Tableau VIII. Score de gravité neurologique.

Rat posé sur la surface			
Marche spontanée			0 - 2
Comportement rotatoire			0 - 2
Poussée latérale		Ipsilatérale	0 - 2
		Controlatérale	0 - 2
Sursaut auditif			0 - 2
Suspension par la queue (20 cm de la surface)			
Flexion du corps			0 - 2
Flexion de la patte	Antérieure	Ipsilatérale	0 - 2
		Controlatérale	0 - 2
	Postérieure	Ipsilatérale	0 - 2
		Controlatérale	0 - 2
Placement de la patte		Ipsilatéral	0 - 2
		Controlatéral	0 - 2
Score /24			

La marche spontanée : l'animal est placé sur une surface plane (paillasse). L'examineur se met en retrait pour observer le déplacement de l'animal. Un animal sans lésion explore la surface tandis qu'un animal avec des séquelles a un comportement exploratoire diminué voire aboli (*freezing*).

Le comportement rotatoire : un animal traumatisé d'un seul hémisphère présente des difficultés pour garder une démarche rectiligne. Il peut se déplacer préférentiellement vers un côté ou avoir des mouvements rotatoires sur lui-même. De plus, les animaux peuvent être hémiplegiques et subir des pertes d'équilibre.

La résistance à la poussée latérale : l'animal est placé sur une surface rugueuse afin que ses griffes puissent s'agripper. L'examineur exerce une poussée sur le flanc gauche, puis droit à l'aide du

manche d'une tige ou d'un bâton. Un animal traumatisé n'est pas assez tonique (ou a des déficits musculaires) pour contrer la poussée et glisse.

Le réflexe auditif : l'examineur claque des doigts et observe si l'animal réagit au bruit soudain (contraction, sursaut ou tressaillement).

La suspension par la queue : l'examineur suspend délicatement l'animal par la queue au plus proche du dos (1 cm de la base) d'une hauteur approximative de 20 cm (les quatre membres ne doivent plus toucher la surface). La rotation du corps, la flexion, l'agrippement ou le croisement des membres (antérieurs et postérieurs du côté ipsilatéral et controlatéral) sont notés. Un animal sans séquelle garde son corps étiré vers la surface.

Le placement des pattes par déclenchement visuel : l'animal suspendu par la queue est approché lentement de la surface jusqu'à ce que le museau soit proche sans contact avec les vibrisses. L'animal sain étendra ses membres antérieurs pour la toucher. Dans le cas des animaux traumatisés, ils peuvent présenter une asymétrie, une flexion/ rétractation ou une agitation de tout le corps

RESULTATS

I. Raffinement du modèle de traumatisme crânien

I.1. Objectif

L'utilisation de l'appareil à percussion latérale de fluide (LFP) engendre une hétérogénéité des blessures induites avec notamment l'apparition d'hémorragies, d'œdèmes, de lésions focales et diffuses. En effet, l'impulsion de fluide produite pénètre dans la cavité extradurale et va comprimer les tissus. Cependant, le volume et la dispersion du sérum physiologique injecté ne peuvent être contrôlés et sont donc variables d'une expérience à une autre, en fonction de l'expérimentateur et des frottements du piston contre le cylindre. L'un des principaux inconvénients de cet appareil provient de son encombrement spatial (190 cm x 46 cm x 120 cm, poids total de 45 kg) le rendant difficilement déplaçable. De plus, le réglage de la pression de l'onde de choc souhaitée est dépendant de l'angle du maillet et, également, de la présence de bulles d'air dans la colonne d'eau. La vérification et la purge pour les éliminer se font lors de la calibration avant le traumatisme crânien (TC), rallongeant temporellement la procédure pour l'induire. Enfin, l'utilisation de cet appareil prévoit le déplacement de l'animal auprès du LFP et donc de le retirer de son cadre stéréotaxique. Cela amène une contrainte supplémentaire tant pour l'animal que pour les études postérieures, comme l'implantation d'électrodes après un TC, où le remplacement du rat dans le cadre est nécessaire. L'objectif de cette étude était de tester un système alternatif au LFP pour limiter ces trois désavantages par un système maniable, rapide à mettre en place et à calibrer, et sans déplacement de l'animal. Comme décrit dans l'introduction (partie IV), il existe un système semblable au LFP qui est commandé par un microprocesseur d'un système pneumatique. Il permet de régler indépendamment la pression délivrée et la durée de l'onde de choc (Kabadi et al., 2010; Wahab et al., 2015). Pour notre part, nous nous sommes tourné vers un autre système de valve pneumatique de type Picospritzer présent au sein de notre laboratoire.

Le système à valve pneumatique est utilisé dans de nombreuses disciplines, notamment dans les études intra- et extracellulaires, mais également comme outil d'injection de produits pharmacoactifs, génétiques ou d'agents infectieux. Le contrôle spatio-temporel précis par l'intermédiaire d'une valve permet d'éjecter sous pression un volume reproductible. L'ouverture de la valve est ajustable avec une mesure allant de 3 à 999 millisecondes, secondes ou minutes. Cet outil semble adéquat tant par sa taille maniable, par son installation prenant peu de temps et de place, par sa calibration facilitée et son réglage plus précis et par le branchement de l'animal à l'appareil via une tubulure. À notre connaissance à ce jour dans la littérature, seul Frey *et al.* (2009) ont mis au point le TC par ce mécanisme montrant une reproductibilité de l'onde de choc, de la présence d'une hémorragie et d'un œdème tissulaire, accompagnés d'un dysfonctionnement neurologique chez les rats.

Dans cette étude, la valve pneumatique a été employée pour induire un TC sévère chez le rat. La sévérité est démontrée par la pression traumatique reçue, l'arrêt respiratoire et la survenue spontanée d'ondes de dépolarisations corticales envahissantes. Néanmoins, un point limite important est à prendre en considération pour la mise en place du modèle : la déchirure de la dure-mère sous l'effet de l'onde de choc peut provoquer la formation d'une hernie en quelques secondes, ce qui impose la mise à mort de l'animal. Le taux de mortalité global comprenant les décès spontanés et les mises à mort liées à la déchirure de la dure-mère ne doit pas dépasser 40 % (Dixon et al., 1987; Kabadi et al., 2010) et doit être le plus bas pour limiter la perte inutile d'animaux, et ainsi respecter la règle des 3R de l'éthique animale. Ce chapitre décrit les variations des ondes de choc produites par la valve pneumatique dans différentes conditions, ainsi que les séquelles physiologiques chez l'animal.

I.2. Matériels et méthodes

I.2.1. Calibration du capteur de pression artérielle

Un capteur de pression artérielle (**Figure 38**, PA, MLT0699 Disposable blood pressure Transducer, ADInstruments, Oxford, UK) a été utilisé pour mesurer la pression délivrée en sortie de l'appareil à induction du TC et qui a été enregistré avec le logiciel LabChart (version 8, ADInstruments Ltd, France). Les valeurs enregistrées sont exprimées en volts. Ce dispositif est optimisé pour mesurer des valeurs de -50 à 300 mmHg mais peut monter jusqu'à des pressions de 4 000 mmHg, c'est-à-dire 5,26 atm.

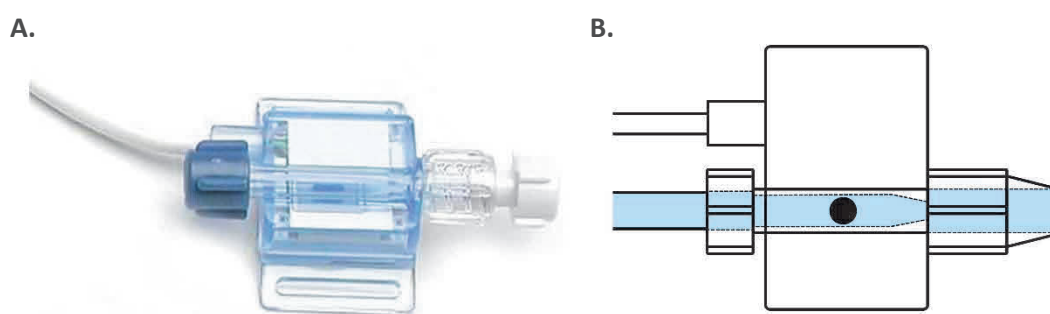


Figure 38. Capteur de pression artérielle. Une photographie du capteur MLT0699 (A, <https://www.adinstruments.com/>) et une représentation schématique avec son compartiment rempli de sérum physiologique immergeant la cellule sensible aux variations de pression (cercle noir, B).

Trois méthodes ont été employées pour étalonner ce capteur : (1) avec de l'air et un sphygmomanomètre (mmHg), (2) via un détendeur avec de l'air (bar) et (3) avec du sérum physiologique et le transducteur de l'appareil LFP (10 mV pour 1 psi) était relié à un oscilloscope et au logiciel LabChart. Le capteurs PA était placé à la suite de celui du LFP. Le marteau était lâché à différents angles (0° à 31°) et la valeur maximale du pic de pression était retenue pour établir la comparaison des deux capteurs. Dans les trois conditions, du sérum physiologique était introduit dans le capteur de PA pour immerger la cellule (**Figure 38. B**). Le capteur de PA présentait une valeur basale de 28 mV, qui a été soustraite pour normaliser les données à 0 atm. Les pressions mesurées par les trois méthodes ont été exprimées en atmosphères (atm) en suivant la relation montrée dans le **Tableau IX**.

Tableau IX. Valeurs des différentes méthodes utilisées pour contrôler la pression pour une atmosphère.

Pour 1 atmosphère (atm)	
Appareil de mesure	Unité de mesure
sphygmomanomètre	760,0 mmHg
Détendeur de protoxyde d'azote	1,013 bar
Transducteur appareil LFP (10 mV/psi)	14,696 psi (146,96 mV)

I.2.2. Dispositif de l'appareil à percussion latérale de fluide

Brièvement, un maillet est lâché depuis un angle et une hauteur déterminant la pression délivrée. Lorsque le maillet frappe le piston du réservoir remplie d'eau, une faible quantité d'eau est éjecté dans la cavité épidurale déformant rapidement le tissu cérébral. Le rat est connecté en sortie du réservoir par une tubulure remplie de sérum physiologique (100 cm et d'un diamètre interne de 2,50 mm, modèle TU0425, SMC) afin de recevoir le TC. Le transducteur de l'appareil LFP était relié à un oscilloscope et au logiciel LabChart pour enregistrer et contrôler les ondes de choc. Les calibrations de l'appareil sont réalisées en circuit fermé via un robinet au niveau du capteur de PA et dix ondes de choc sont réalisées pour les calibrations avant et après TC. Les pressions appliquées étaient de 3 ; 3,8 ou 5,4 atm mesurées par le transducteur du LFP.

I.2.3. Dispositif du système de valve pneumatique

L'appareil à valve pneumatique (**Figure 39**, Picospritzer III, Parker Hannifin Corporation, Hollis, USA) est utilisé pour modéliser le TC. Le réglage de la pression va de 10 à 150 psi, soit de 0,68 à 10,2 atm. Différentes conditions ont été testées *in vitro* : (1) remplissage de la tubulure avec de l'air ou du sérum physiologique (durée ouverture de 20 ms et pression de 3,40 et 4,08 atm), (2) variation de la durée d'ouverture de la valve à 5 ;10 ; 15 et 20 ms (pression de 3,40 atm), et (3) longueur de la tubulure de 230 mm et 770 mm (durée d'ouverture de 10 ms et pression de 3,40 atm). Concernant la partie *in vivo*, la durée était de 8 ou 16 ms avec une pression de 3,14 ; 3,79 ; 4,15 et 4,62 atm. Dix ondes de choc ont été réalisées pour les calibrations avant et après TC en position robinet fermé, afin de s'assurer qu'aucune bulle ne soit introduite dans la tubulure et/ou le capteur de PA, et d'en vérifier la pression.

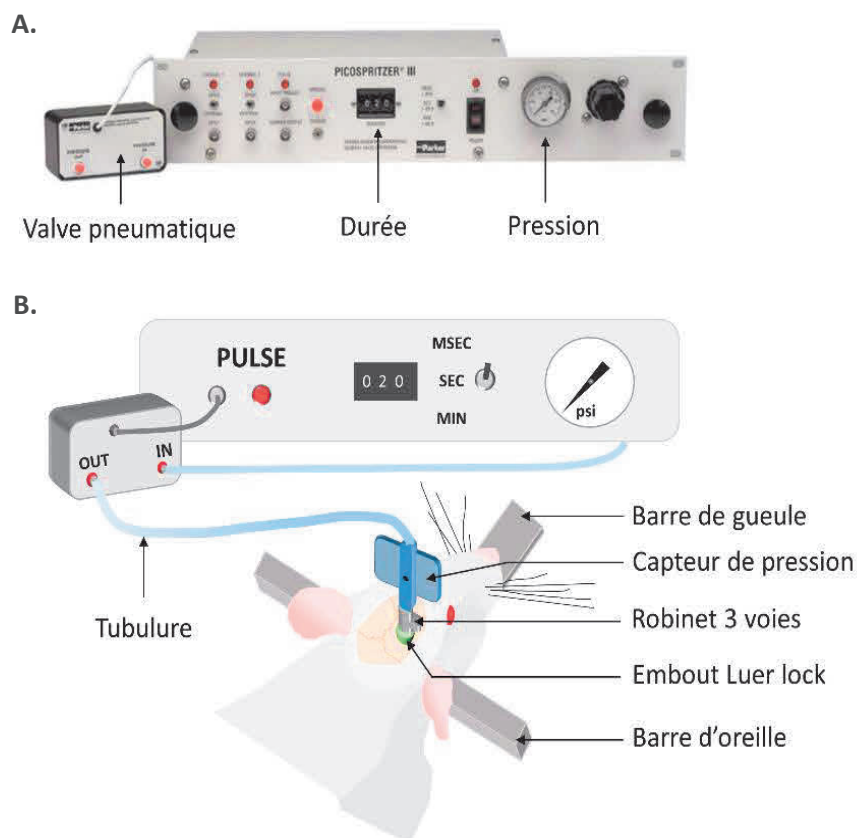


Figure 39. Appareil à valve pneumatique. A. Photographie de l'appareil avec la valve pneumatique et les régulateurs pour la pression et la durée d'éjection B. Schéma représentant l'appareil avec l'ajout de la tubulure, du capteur de pression artérielle connecté à un robinet et de l'embout Luer lock en sortie. Illustration d'après <https://ph.parker.com/us/12051/en/picospritzer-iii-intracellular-microinjection-dispense-systems-picospritzer-micro-dispense-system>.

I.2.4. Animaux

Les animaux utilisés lors de cette étude sont des rats femelles et mâles de souche Sprague-Dawley provenant de ENVIGO (Gannat, France). Les protocoles ont été approuvés par le comité d'éthique régional (APAFIS#10019 et APAFIS#10044) et réalisés conformément à la directive européenne 2010/63/UE. Les expérimentations se sont déroulées dans l'animalerie commune du Centre de recherches en Neurosciences de Lyon (autorisations A693881766 et DDA69675-01). Les animaux étaient âgés entre 8 et 20 semaines (12 et 11 semaines en moyenne respectivement pour les femelles et les mâles) lors de la chirurgie et pesaient 226 ± 4 g pour les femelles et 311 ± 8 g pour les mâles. Les rats étaient stabulés de 2 à 5 par cages, et étaient maintenus en cycle de 12 h d'éclairage (7 h - 19 h) avec une température de 22 ± 2 °C et d'une hygrométrie de 50 ± 5 %. Tout au long des protocoles, les rats ont eu accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*. La cage des animaux était enrichie d'un bâton en peuplier, de lanières de papier frisées (*sizzle-nest*) et de papier absorbant.

I.2.5. Chirurgie et induction du traumatisme crânien

La chirurgie réalisée était celle décrite précédemment (Eakin et al., 2015). Brièvement, les animaux ont été anesthésiés par isoflurane, intubés puis mis sous ventilation artificielle. L'anesthésie était maintenue à 1,5 - 2,5 % pendant la chirurgie. Le rat était placé dans un cadre stéréotaxique afin de réaliser la craniotomie de 4 mm de diamètre (-3,8 mm en antéro-postérieur et à 3 mm en latéral droit). Un embout Luer lock a été fixé au niveau de la craniotomie et rempli de sérum physiologique. Après la calibration de l'appareil d'induction du TC (dispositif du LFP ou de la valve pneumatique), le capteur de PA a été fixé à l'embout Luer lock relié au dispositif par l'intermédiaire d'une tubulure remplie de sérum physiologique. L'anesthésie a été arrêtée et l'induction du TC a été effectuée dès le retour du réflexe du retrait de la patte. Ensuite, le dispositif comprenant l'embout et le capteur de PA ont été retirés et l'appareil d'induction du TC a de nouveau été calibré.

Concernant le groupe sham, les animaux ont eu une procédure chirurgicale identique mais n'ont pas reçu le TC. L'animal a reçu une injection en SC de sérum physiologique (2,5 mL) au niveau des flancs pour limiter la déshydratation.

I.2.6. Surveillance des données physiologiques du rat

I.2.6.a. *Données systémiques : fréquences cardiaques, respiratoires et saturation en oxygène*

En plus du contrôle de la température corporelle, les paramètres vitaux tels que les fréquences cardiaques et respiratoires, ainsi que la saturation en oxygène ont été suivis à l'aide d'un oxymètre de pouls (MouseOx Plus, STARR Life Sciences Corp., Oakmont, PA, USA). Lors d'une forte désaturation en oxygène, la fraction inspirée d'oxygène est augmentée de 30 ou 40 %. Les données sont lues et enregistrées par le logiciel LabChart.

I.2.6.b. *Flux sanguin cérébral et électrocorticographie*

Avant l'induction du TC, les muscles en temporal ont été dégagés. L'os a été aminci sur un diamètre de 1,5 mm en regard de la craniotomie, afin de placer le laser Doppler (LDF, AdInstrument) à quelques micromètres (ne touchant pas l'os). Ce dernier permet d'estimer le débit sanguin cérébral (DSC) grâce à une fibre optique. Le DSC est exprimé en pourcentage de variation par rapport au niveau basal.

Après le TC, le capteur de PA et l'embout cimenté à l'os ont été retirés, et deux craniotomies de 1 mm de diamètres ont été réalisées en frontal ipsilatéral (antéropostérieur : 1,5 mm). Une pipette en verre étirée puis remplie d'une solution de chlorure de sodium (2 M) et de citrate de sodium (1 M), et contenant un fil d'argent chloruré (Ag/AgCl) a été positionnée à 150 - 200 μm de profondeur dans le cortex sous-jacent à la craniotomie pour l'induction du TC. Cette électrode d'argent et une référence Ag/AgCl placées sous la peau de l'animal sont reliées à un préamplificateur (npi electronic GmbH), puis à un amplificateur réglé en mode DC (EXT-10C, npi electronic GmbH). Ce dispositif mesure l'activité électrocorticographique (ECoG, **Figure 4.A**). Les signaux du laser Doppler et de l'ECoG sont également lus par le logiciel LabChart. Une DCE peut être déclenchée lors de l'implantation de l'électrode dans le cortex cérébral. Cependant, elle n'est pas toujours observable suivant le temps d'installation du dispositif.

Ces deux outils permettent d'enregistrer les DCE spontanées survenant après l'induction du TC, observables par une augmentation du DSC (**Figure 40.B**) et d'une diminution du potentiel de champs transitoires (**Figure 40.C**). L'enregistrement a été réalisé pendant 6 h post-TC. Dans la craniotomie la plus latérale, une légère piqûre (*pin prick*) de la dure-mère a été induite en fin d'expérience pour provoquer une DCE et s'assurer du bon fonctionnement des appareils.

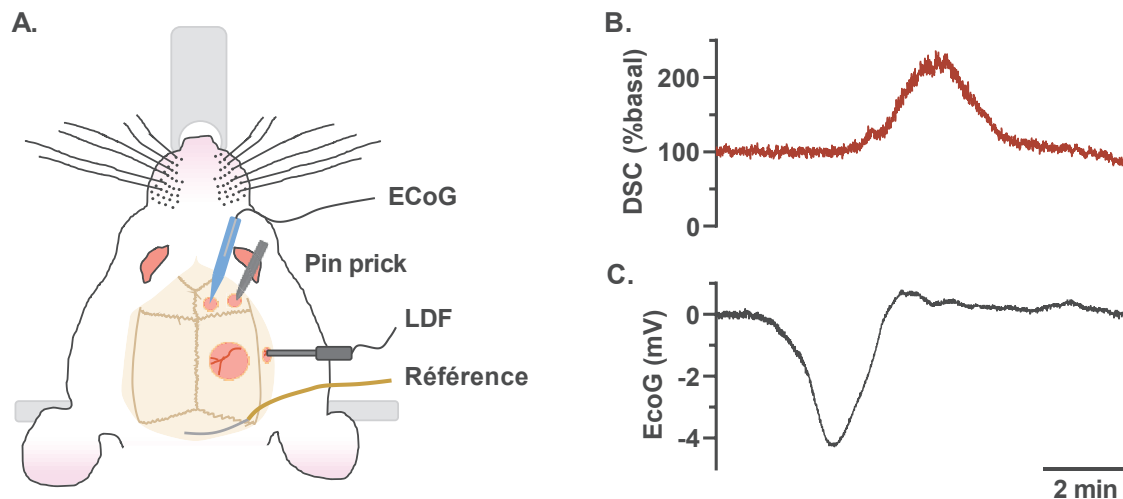


Figure 40. Suivi du débit sanguin cérébral et électrocorticographie. A. Disposition de l'électrode d'électrocorticographie (ECoG) au niveau du cortex frontal, du laser Doppler (LDF, pour la mesure du débit sanguin cérébral, DSC) en temporal et de la craniotomie en frontal pour induire une dépolarisation corticale envahissante (DCE) en appuyant sur la dure-mère (*pin prick*). Tracé d'une DCE induit par *pin prick* observable par la fluctuation du DSC (B) et du signal ECoG (C). Suivant la zone de déclenchement de la DCE, le LFP et l'ECoG ne mesurent pas simultanément l'évènement, comme dans cet exemple.

I.2.7. Barrière hémato-encéphalique

I.2.7.a. Bleu d'Evans et prélèvement du cerveau

Une injection intrapéritonéale (IP) de 5 mL de bleu d'Evans (2 % dans du sérum physiologique, Kuhlmann) à 37°C a été effectuée 3 h après l'induction du TC ou de la craniotomie pour le groupe sham. Six heures après le TC, les animaux ont été mis à mort par une injection de pentobarbital sodique (100 mg/kg, IP, Euthasol, Centravet), puis ont été perfusés en intracardiaque (débit de 30 mL/min avec 300 mL) d'une solution de tampon phosphate salin (PBS, 0,1 M, pH 7,4, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) mélangée à 0,1 % d'héparine à 4°C, et ensuite avec 300 mL d'une solution de paraformaldéhyde à 4 % (PFA mélangé avec du PBS 0,1M à 4°C). Le cerveau a été prélevé et placé dans une solution de PFA 4 % pendant deux jours, puis dans une solution de saccharose à 30 % les deux jours suivants. Enfin, le cerveau a été congelé en le plongeant dans une solution d'isopentane à -50°C puis stocké à -80°C.

I.2.7.b. Scanner de lame

Les cerveaux des rats ont été coupés d'une épaisseur de 50 μm dans le plan coronal avec un cryostat (Micron NX50) à -20°C . Les tranches ont été récupérées dans des plaques de 24 puits remplies de PBS 0,1M, puis montées entre lame et lamelle avec du milieu de montage contenant du DAPI (Fluoroshield, Sigma) et scellées avec du vernis à ongle (solution de montage organique).

Les lames ont été observées au scanner de lame Axio Scan.Z1 au Centre Imagerie Quantitative Lyon EST (CIQLE, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France) avec un objectif x5 (NA : 0,25, Zeiss Fluar) et visualisées à l'aide du logiciel ZEN. Les images ont été acquises en deux étapes : le DAPI est révélé par une longueur d'onde d'excitation à 405 nm et une émission à 412 - 438 nm, et le bleu d'Evans par une excitation à 568 nm et une émission à 578 - 640 nm. Les images ont été analysées avec le logiciel FIJI (<https://imagej.net/Fiji>).

I.2.8. Statistique

Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM. Dans un premier temps, la normalité des données et des résidus ont été estimés via le test de Shapiro-Wilk et l'homogénéité des variances par le test de F ou de Levene. La comparaison deux à deux a été fait avec le test de Student lorsque ces conditions sont remplies, sinon un test de Mann-Whitney U est effectué. Les données non normales ou hétérogènes à plus de deux groupes ont été comparées avec le test de Kruskal-Wallis ou avec le test de Friedman pour les mesures répétées. La comparaison des groupes avec deux facteurs a été réalisée par une ANOVA à deux facteurs, suivie par un test post-hoc de Bonferroni. Les différences ont été considérées comme significatives si $p < 0,05$.

I.3. Résultats

I.3.1. Calibration *in vitro*

I.3.1.a. Etalonnage du capteur de pression artérielle

La pression du TC est mesurée par le capteur de PA en sortie des appareils, directement au niveau du crâne de l'animal. Afin de reproduire l'onde traumatique réalisée à partir de l'appareil LFP avec la valve pneumatique, il convient de vérifier la sensibilité du capteur PA par un étalonnage. Les valeurs perçues par le capteur de PA sont exprimées en volts et lues par le logiciel Labchart. Le capteur de pression a été étalonné de trois manières différentes en utilisant un sphygmomanomètre, un détendeur de gaz ou le capteur de pression équipant le dispositif du LFP. L'étalonnage a été réalisé entre 0 et 5,70 atm et a montré une linéarité du capteur dans cette gamme. Le capteur PA atteint sa limite de détection à 5,70 atm. L'équation obtenue avec le capteur du LFP, $y = 58,79x$, sera donc utilisé pour définir les pressions mesurées par le capteur PA (Figure 41.A-C).

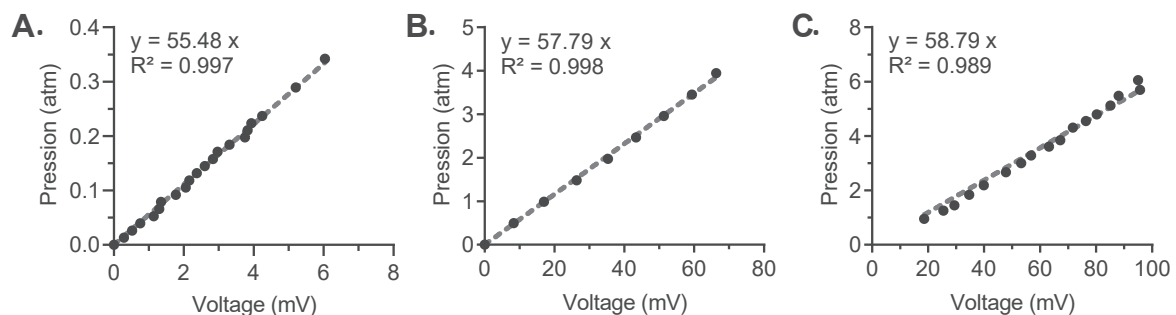


Figure 41. Calibration du capteur de pression artérielle. L'étalonnage du capteur est réalisé avec (A) un sphygmomanomètre (n = 6), (B) un détendeur mural (n = 6) et (C) du capteur placé sur l'appareil à percussion latérale de fluide (n = 8). Moyenne \pm SEM, ligne pointillée : droite de régression linéaire. Moyenne \pm SEM.

I.3.1.b. Onde de choc type produit avec l'appareil LFP

Dans la littérature, l'animal est le plus souvent déplacé pour apposer sa tête à l'embout de la colonne d'eau de l'appareil LFP. Nous avons reproduit deux pressions classées sévères. Les ondes de choc induites par l'appareil LFP *in vitro* ont été mesurées par le capteur de LFP en sortie de la colonne d'eau. La durée de l'onde de choc était comprise entre 20 et 22 ms. Pour des pressions de $3,08 \pm 0,02$ et $3,88 \pm 0,03$ atm (n = 6), la valeur maximale était atteinte entre 9 et 10 ms. La pression mesurée par le capteur LFP ne redescend pas à son niveau basal. Il reste en effet une légère pression résiduelle dû

au fait que le piston ne revient pas exactement à sa position initiale. Cette pression est libérée en ouvrant un des robinets de vidange de la colonne d'eau, avant chaque nouveau test d'onde de choc (**Figure 42**).

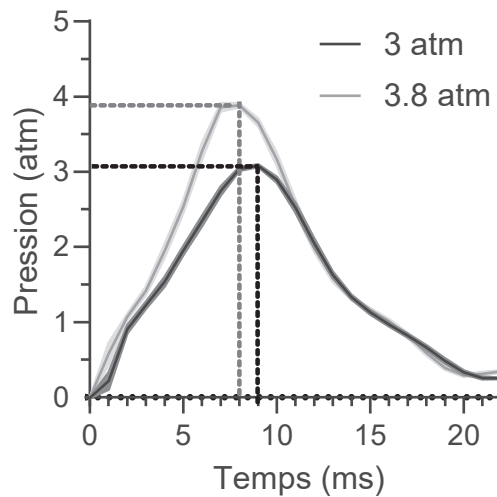


Figure 42. Profil de l'onde de choc induite à 3 et 3,8 atm par l'appareil de percussion latéral de fluide conventionnel. Les pressions des ondes de choc sont utilisées pour induire un traumatisme crânien sévère chez le rat. Ces pressions sont mesurées par le transducteur placé en sortie de l'appareil. Moyenne \pm SEM, n = 6.

I.3.1.c. Profil de l'onde de choc produite par l'appareil LFP avec une tubulure

Une tubulure de 100 cm remplie de sérum physiologique a été installée sur l'appareil LFP pour éviter le déplacement de l'animal hors du cadre stéréotaxique lors des essais chez le rat. Pour cette première série de tests sans animaux, la tubulure se terminait par un robinet fermé. Dans cette configuration, le système de LFP était équipé de deux sondes de pression, la première située au niveau de la colonne d'eau, la seconde en sortie de tubulure au contact du crâne de l'animal. Pour pallier à l'amortissement dû à cette tubulure, une pression de 4,3 atm a été utilisée. Les courbes de pression mesurées par le capteur LFP sans et avec la tubulure avaient un profil similaire. Lorsque la colonne d'eau était prolongée par une tubulure, la pression mesurée par le capteur PA en bout de tubulure était plus importante que celle mesurée au niveau de la colonne d'eau (**Figure 43.A**). Les comparaisons de pressions, des temps de montés et de décroissances sont effectuées par une ANOVA à 2 facteurs sur mesures répétées, et présentent une interaction significative pour les facteurs « type de capteur » et « présence de tubulure » ($F(1, 18) = 331,6, p < 0,001$; $F(1, 18) = 89,37, p < 0,001$; $F(1, 18) = 155,6, p < 0,001$). Sans tubulure, les deux capteurs mesurent un profil de pression très similaire avec

seulement une différence de temps de montée ($7,75 \pm 0,4$ capteur PA et $8,88 \pm 0,13$ ms capteur LFP, $p = 0,0064$). Avec la tubulure, le capteur de PA mesure une pression maximale significativement plus haute ($p < 0,001$), ainsi qu'un allongement du temps de montée ($p < 0,001$, **Figure 43.B**) et un raccourcissement du temps de décroissance ($p < 0,001$, **Figure 43.C**). Le capteur LFP est seulement impacté par un temps de décroissance plus long ($p = 0,009$, **Figure 43.D**).

Ces résultats indiquent que le profil de l'onde de choc induite par le LFP est différent au niveau de la colonne d'eau et en bout de tubulure.

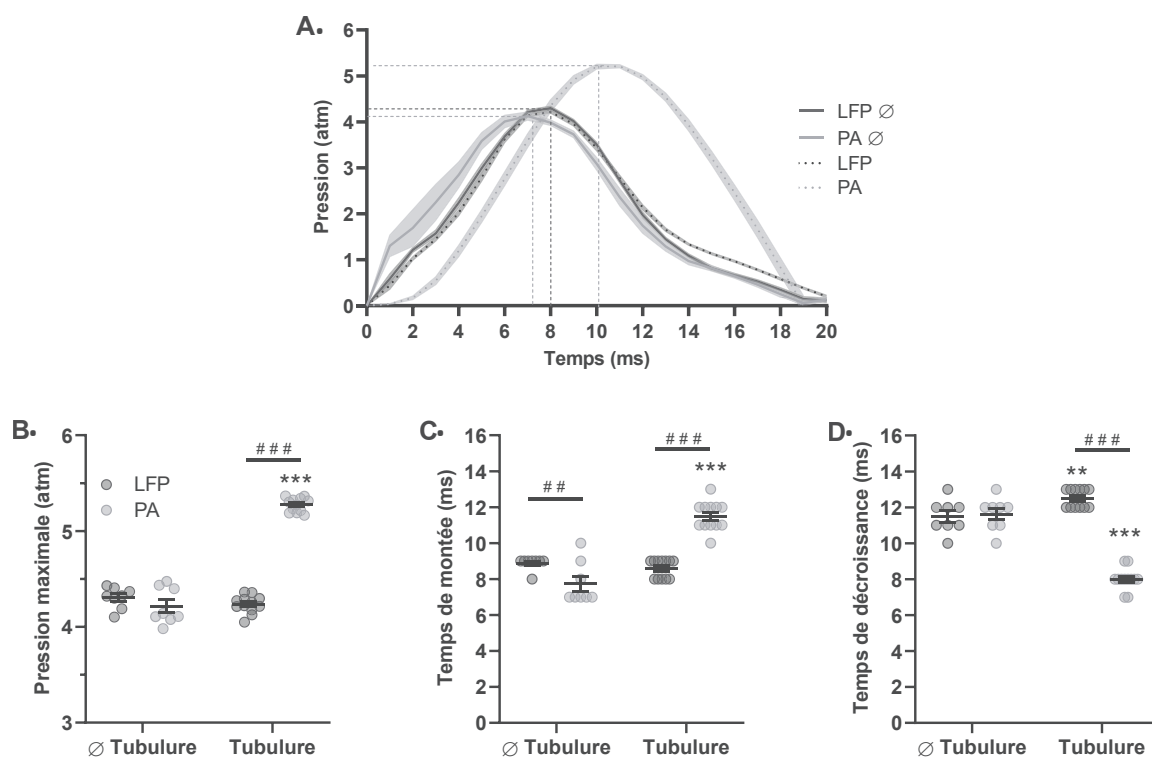


Figure 43. Observation de l'onde de choc induite par le dispositif LFP conventionnel avec ou sans tubulure reliant le capteur PA et le transducteur LFP. **A.** Profils des ondes de choc avec ou sans tubulure pour une pression induite de 4,30 atm mesuré par le capteur PA et le transducteur du LFP, ainsi que la pression maximale (**B**), le temps pour atteindre la pic (**C**) et le temps de décroissance jusqu'au retour basal (**D**). LFP ∅ : transducteur du LFP sans tubulure ($n = 8$), PA ∅ : capteur de pression artérielle sans tubulure ($n = 8$), LFP : transducteur du LFP avec tubulure ($n = 12$), PA : capteur de pression artérielle avec tubulure ($n = 12$). Moyenne \pm SEM. Test post-hoc Bonferroni après une ANOVA à 2 facteurs sur mesure répétée, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ sans versus avec tubulure, ### $p < 0,001$ capteur LFP versus capteur PA.

1.3.1.d. Prise en main de la valve pneumatique

L'utilisation de la valve pneumatique nécessite une tubulure pour raccorder le site d'induction du TC à l'appareil. Contrairement au matériel LFP, nous pouvons prédéfinir un temps d'ouverture et une pression maximale (en psi) pour la valve pneumatique. Au cours de nos essais, nous avons d'abord utilisé une tubulure intégralement remplie d'air, puis nous avons introduit un volume constant de sérum physiologique en contact avec la dure mère. Nous avons utilisé une tubulure courte de 230 mm et une autre plus longue de 770 mm. Ces deux tubulures contenaient un volume égal de 706 mm³ de sérum physiologique, le reste de la tubulure étant rempli d'air. Ce volume de sérum physiologique est nécessaire pour éviter l'infiltration de bulles d'air dans l'espace sous-dural, et différait par la quantité d'air contenu dans le dispositif avec 57,2 % d'air dans la tubulure courte et 81,06 % dans la tubulure longue.

Dans un premier temps, nous avons étudié les ondes de choc obtenues pour un temps d'ouverture de la valve de 20 ms, à 3,40 atm et à 4,08 atm avec la tubulure courte. Le profil des courbes obtenues est en cloche avec un plateau (**Figure 44.A**). Lorsque la tubulure était remplie de sérum physiologique, la pression maximale était supérieure à celle obtenue avec une tubulure remplie d'air ($p < 0,001$, **Figure 44.B**).

Pour mieux nous approcher de l'onde de choc obtenue avec le LFP, nous avons fait varier le temps d'ouverture de la valve à 5, 10, 15 et 20 ms (pression de 3,40 atm avec la tubulure courte). Une ouverture de 5 ms de la valve ne permet pas d'atteindre la pression maximale de 3,40 atm imposée par la valve. Pour les trois autres temps d'ouverture, la pression maximale est atteinte à $9,50 \pm 0,29$, $9,75 \pm 0,25$ et $9,25 \pm 0,25$ ms sans différence significative (Kruskal-Wallis, $p = 0,77$, $n = 4$). Les durées de 15 et 20 ms induisent une pression supérieure à 3 atm qui perdure pendant 10 et 15 ms, ce qui n'est pas souhaitable *in vivo* (**Figure 44.C**). C'est pourquoi ces temps d'ouverture sont écartés.

Enfin, nous avons comparé les ondes de choc obtenues pour les deux longueurs de tubulure différentes. Pour la tubulure longue, la pression appliquée a été augmentée à 5,85 atm pour pallier l'amorti induit par la couche d'air contenue dans la tubulure et obtenir une pression maximale de $3,54 \pm 0,008$ atm comparable à celle obtenue avec la tubulure courte. La pression maximale est atteinte avec des temps de montée de $9,75 \pm 0,16$ et $11,0 \pm 0,00$ ms respectivement ($p = 0,0002$) mais le retour à la pression basale se faisait plus lentement avec la tubulure longue (**Figure 44.D**, $9,38 \pm 0,18$ ms *versus* $34,25 \pm 0,88$ ms, test de Mann-Whitney, $p = 0,0002$, $n = 8$).

Cette phase de tests réalisée en absence d'animaux révèle que l'onde de choc induite par le LFP est modélisée de façon optimale par des temps d'ouverture de valve de 8-10 ms, et une pression délivrée de l'ordre de 3,40 atm.

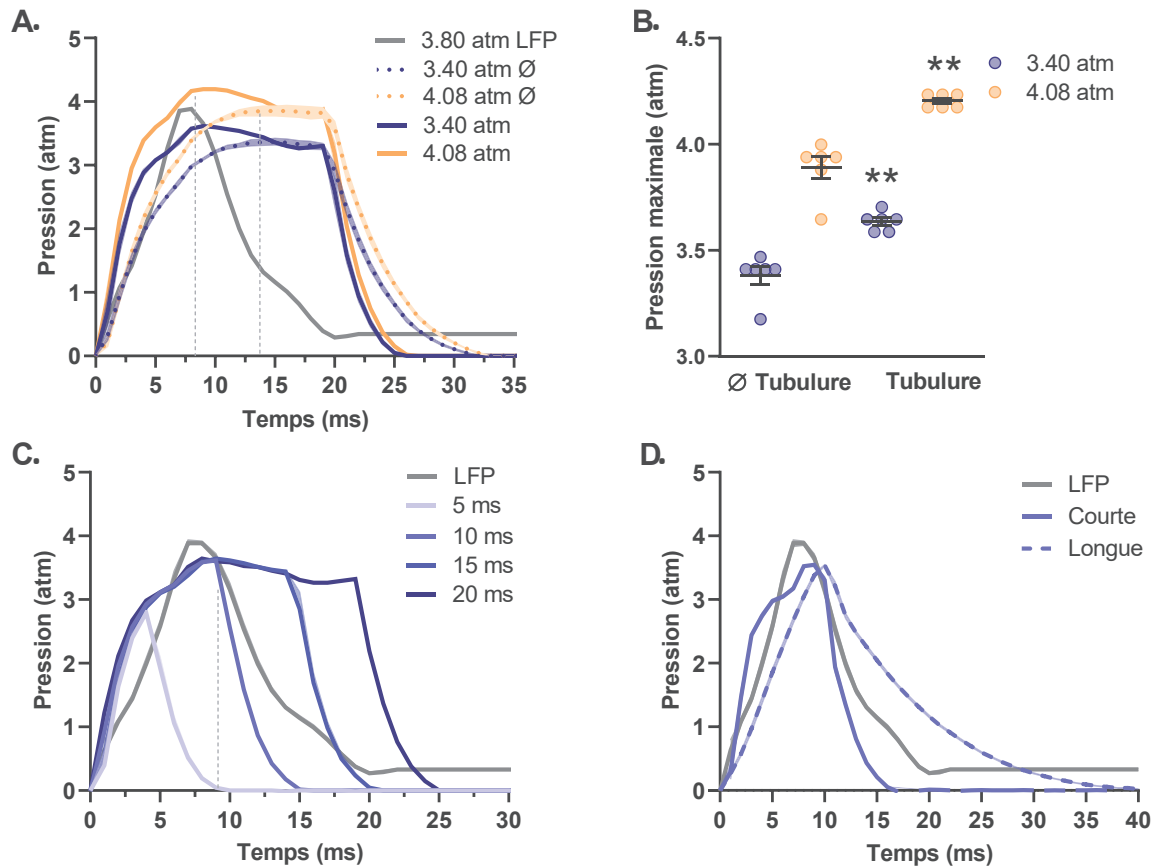


Figure 44. Caractérisation de l'onde de choc induite par la valve pneumatique. A. Variation de l'onde de choc avec une tubulure remplie ou non de sérum physiologique et à deux pressions induites (n = 6). B. Pression maximale suivant la condition air *versus* sérum physiologique dans la tubulure à deux pressions induites. Test de Mann-Withney, ** $p < 0,01$, n = 6. C. Variation de la pression de l'onde de choc en fonction du temps d'ouverture de la valve (n = 4). D. La décroissance de la pression est plus lente avec une tubulure plus grande et donc un volume d'air plus grand pour une induction de 3,55 atm avec un temps d'ouverture de la valve de 10 ms (n = 8). Moyenne \pm SEM.

I.3.2. Réalisation du TC *in vivo*

Dans un deuxième temps, nous avons testé ces différents dispositifs chez l'animal. Pour éviter de déplacer l'animal hors du cadre stéréotaxique, et risquer d'induire une interruption d'anesthésie mal contrôlée, nous avons testé l'appareil de LFP en présence d'une tubulure (100 cm de long) permettant d'atteindre le cadre de contention. Nous avons également testé quatre conditions utilisant la valve pneumatique (**Tableau X**) : trois conditions avec une tubulure courte (1) remplie d'air, (2) avec sérum physiologique et pression modérée (3,2 atm), (3) avec sérum physiologique et pression sévère (4,6 atm), et une condition avec une tubulure longue, sérum physiologique et pression sévère (4,2 atm).

Tableau X. Les cinq conditions d'induction du traumatisme crânien testées chez le rat anesthésié.

Groupe	n	Tubulure	Sérum physiologique	Temps ouverture valve (ms)	Intensité appliquée (atm)
LFP (A)	11	Longue	Oui	/	5,38 ± 0,30
B	10	Courte	Non	8	3,79 ± 0,63
C	8	Courte	Oui	8	3,14 ± 0,16
D	23	Courte	Oui	8	4,62 ± 0,03
E	14	Longue	Oui	16	4,15 ± 0,06

I.3.2.a. Différence de l'onde de choc en pré-calibration et du TC

Pour les essais *in vivo*, les dispositifs ont été calibrés avec le robinet fermé en pré- et post- TC. Au contraire, la pression délivrée était mesurée avec le robinet ouvert et la dure-mère exposée lors de l'induction du TC chez les rats. Les calibrations post-TC n'ont pas été détaillées car pour plusieurs animaux induits avec la valve pneumatique, des bulles étaient apparues dans la tubulure et donc modifiaient les pressions, ainsi que les temps de montées et de décroissances.

Dans le groupe LFP, la pression mesurée par le capteur PA diminue de 57,36 % entre la pré-calibration et l'induction du TC (respectivement $5,84 \pm 0,11$ atm et $2,49 \pm 0,19$ atm, test post-hoc de Bonferroni, $p < 0,0001$, $n = 8$). Cette différence de pression n'est pas observée par le capteur situé sur la colonne d'eau (Figure 45.A1-A2, $5,18 \pm 0,12$ atm pré-calibration versus $4,90 \pm 0,06$ atm TC, $p = 0,143$). En pré-calibration, le capteur PA mesure une pression légèrement plus haute que celui du LFP ($p = 0,04$, $n = 8$), tandis que cette différence était plus marquée lors du TC ($p < 0,0001$). *In vivo* lorsque le robinet est ouvert, la propagation de l'onde n'est pas stoppée et se propage dans la cavité épidurale, heurtant la surface de la dure-mère et amoindrissant sa pression. Le capteur du LFP avant la tubulure ne peut mesurer cet effet.

Lorsque le TC a été induit avec la valve pneumatique connectée à une tubulure courte remplie d'air, la pression diminue significativement de $3,79 \pm 0,06$ atm en pré-calibration à $3,34 \pm 0,06$ atm lors du TC (Figure 45.B1-B2, test de Wilcoxon, $p = 0,002$, $n = 10$). Cette diminution significative était également valable quand la tubulure était remplie de sérum, de $3,32 \pm 0,10$ à $2,62 \pm 0,23$ atm pour le groupe C (Figure 45.C1-C2, $p = 0,0078$, $n = 8$), de $4,62 \pm 0,03$ à $3,72 \pm 0,08$ atm pour le groupe D avec une pression sévère (Figure 45.D1-D2, $p < 0,0001$, $n = 23$) et pour le groupe E avec une tubulure longue de $4,15 \pm 0,06$ à $3,41 \pm 0,073$ atm (Figure 45.E1-E2, test de Student apparié, $p < 0,0001$, $n = 14$).

Aucune différence n'est observée pour le temps d'atteinte de la pression maximale entre la pré-calibration et le TC dans les groupes avec la valve pneumatique. Cependant, le groupe LFP présentait une interaction significative entre les capteurs du LFP et PA au cours du temps (ANOVA 2 voies, $p = 0,0008$, $n = 8$). Le capteur de PA mesurait une augmentation significative du temps de montée de la pression lors du TC (post-hoc de Bonferroni, $p = 0,0004$, $n = 8$), mais pas avec le capteur du LFP. De plus, ce temps était significativement plus long lorsqu'il était mesuré par le capteur PA en pré-calibration ($11,38 \pm 0,42$ ms capteur PA *versus* $8,0 \pm 0,0$ ms capteur LFP, $p = 0,0014$) et lors du TC ($15,5 \pm 0,71$ ms capteur PA *versus* $8,25 \pm 0,16$ ms capteur LFP, $p < 0,0001$, **Figure 45.A3**).

Enfin, lors de l'induction du TC, le temps de décroissance de la pression n'était pas différent de la pré-calibration et le TC pour les groupes B (tubulure courte sans sérum physiologique à pression modérée, **Figure 45.B3**) et E (tubulure longue avec sérum physiologique et une pression sévère, $53,93 \pm 1,57$ ms pré-calibration *versus* $56,36 \pm 1,76$ ms TC (**Figure 45.E3**)). Pour le groupe LFP, le temps de décroissance était significativement augmenté lors du TC quand il était mesuré par le capteur PA (test de Bonferroni, $p < 0,0001$) et non pas le capteur LFP. En pré-calibration ce temps était significativement plus faible pour le capteur PA ($9,5 \pm 0,19$ ms) que celui du LFP ($13,63 \pm 0,18$ ms, $p = 0,0103$), mais lors du TC, le capteur PA mesurait un temps de décroissance plus long ($32,28 \pm 1,25$ ms capteur PA *versus* $13,38 \pm 0,32$ ms capteur LFP, $p < 0,0001$). Cependant, le temps de décroissance était significativement plus long pour le groupe C (**Figure 45.C3**, tubulure courte avec sérum physiologique à pression modérée, $8,63 \pm 0,53$ atm pré-calibration *versus* $20,0 \pm 0,60$ atm TC, $p = 0,0078$, $n = 8$) et le groupe D (**Figure 45.D3**, tubulure courte avec sérum physiologique et pression sévère, $p < 0,0001$, $n = 23$).

In vivo, la tubulure courte avec de l'air n'a pas d'influence sur l'onde de choc, tant pour la pression que pour les temps du pic et de décroissance (groupe B avec $n = 10$ *versus* C avec $n = 8$). Néanmoins l'augmentation de la pression délivrée provoque un rehaussement de la pression reçue et une légère diminution du temps de décroissance (groupe C *versus* D avec $n = 23$, test de Kruskal-Wallis, respectivement $p < 0,001$ et $p = 0,047$). Une tubulure plus longue augmente les temps de pression maximal et de décroissance (groupe D *versus* E avec $n = 14$, $p < 0,001$).

En conclusion, lorsque le robinet était ouvert et que l'onde de choc était appliquée directement sur la dure-mère pour induire le TC, la pression maximale était toujours réduite et le temps de décroissance augmenté. Ce phénomène est probablement dû à l'injection de fluide dans l'espace épidual qui agit comme un vase d'expansion. Nous nous sommes ensuite intéressés aux séquelles et aux conséquences physiologiques retrouvées pour les animaux dans ces cinq conditions.

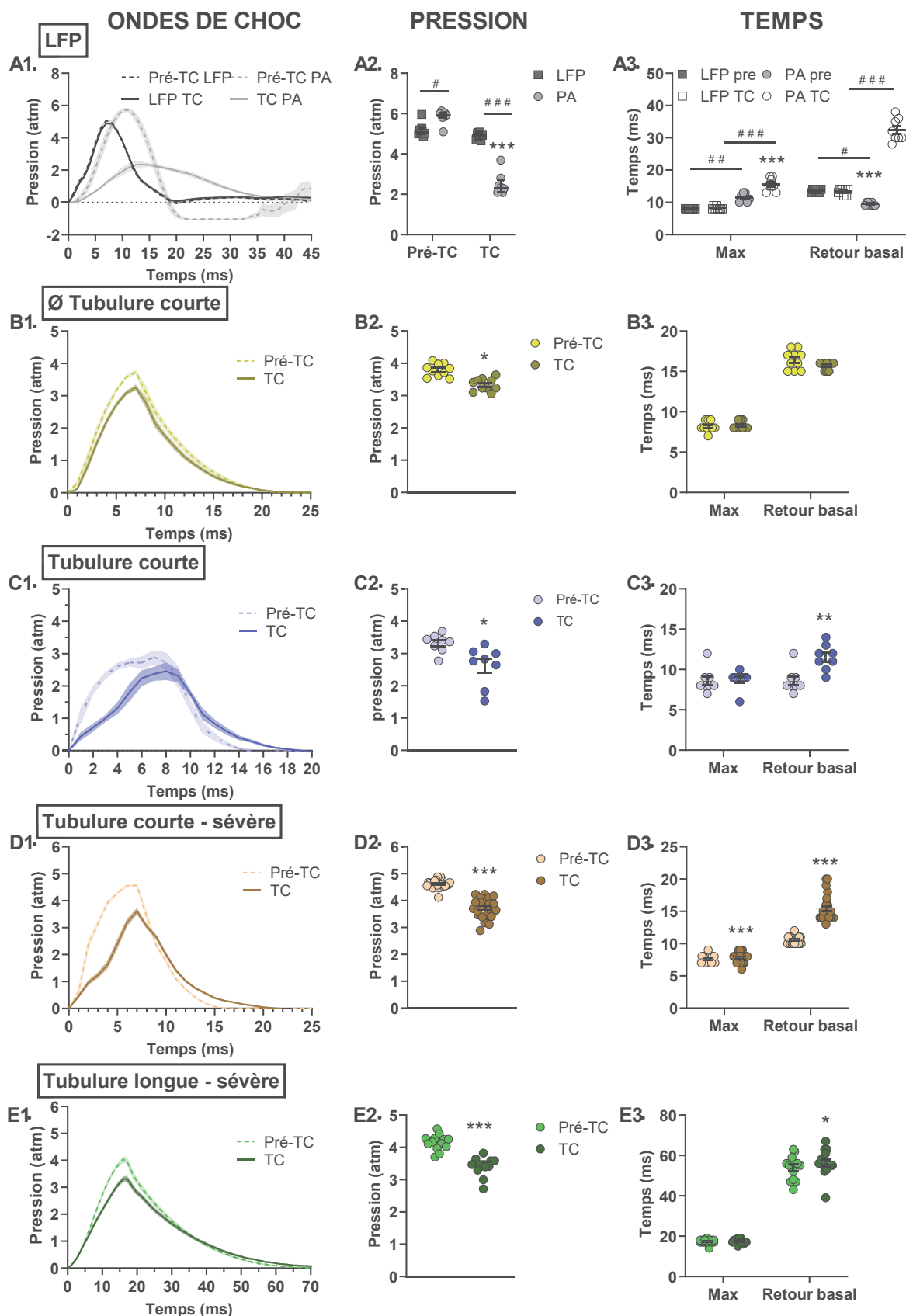


Figure 45. Profils des ondes de choc lors de la calibration pré-traumatique et du TC. (A1 – E1) Profils des ondes de choc en calibration pré-TC et lors de l'induction du TC, ainsi que les variations de la pression maximale (A2 – E2) et les temps de pression maximal et de décroissance (A3 – E3). LFP : n = 8, B : n = 8, C : n = 8, D : n = 21, E : n = 12. ANOVA 2 voies pour le groupe LFP, LFP versus capteur PA : # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$. Test de Wilcoxon, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Moyenne \pm SEM.

1.3.2.b. Séquelles physiologiques du traumatisme crânien sévère

La déchirure de la dure-mère lors du TC est un point limite pour nos études avec réveil chez l'animal, car le modèle devient un TC avec pénétration et une hernie cérébrale se développe immédiatement après la déchirure, ce qui n'est pas compatible avec le *monitoring* intracérébral prévu dans notre laboratoire. De plus, le taux de mortalité doit être faible (< 40%) pour réduire le nombre d'animaux utilisés et respecter la réglementation éthique des 3R.

Les rats mâles, d'une part, et femelles de l'autre, étaient homogènes en poids et en âge (Mann-Whitney U, $p > 0,05$) mise à part une différence significative entre l'âge de rats du groupe D et celui de ceux du groupe LFP (Kruskal-Wallis, $p = 0,013$, $n = 10$ pour les mâles et $p = 0,032$, $n = 13$ pour les femelles). Les résultats des séquelles post-traumatiques sont représentés dans le **tableau XI**.

L'effectif de certains groupes en fonction du sexe étant trop petit, les comparaisons statistiques sont peu adaptées, mais ont été réalisées afin d'apporter un ordre d'idée de la différence liée au sexe. Dans le groupe LFP, l'arrêt respiratoire avait une tendance plus importante chez les femelles ($257,40 \pm 128,60$ min, $n = 3$) avec près de 4 h supplémentaires que les mâles ($0,5 \pm 0,25$ min, $n = 7$, test de Mann-Whitney, $p = 0,067$). Cinquante % des mâles étaient morts et avaient une déchirure de la dure-mère après le TC contrairement aux femelles qui ont survécu sans cette déchirure. Les animaux présentaient un taux d'hématome sous-dural (HSD) de 66,67 % pour les femelles et de 50 % pour les mâles. La tubulure remplie d'air (B) a conduit à une mortalité de 66,67 % pour les mâles et de seulement 25 % pour les femelles avec un arrêt respiratoire de 28 min supplémentaires pour ces dernières ($8,00 \pm 3,00$ min mâles, $p = 2$, *versus* $36,33 \pm 13,30$ min pour les femelles, $p = 3$). Les taux de lésions de la dure-mère (25 % pour les femelles *versus* 16,67 % pour les mâles) et d'HSD (respectivement 75 % et 50 %) sont proches entre les deux sexes. Dans le groupe C (tubulure courte avec sérum physiologique), l'arrêt respiratoire avait duré $32,75 \pm 11,29$ min pour les femelles ($n = 4$) et $27,50 \pm 14,34$ min pour les mâles ($n = 4$) sans différence significative ($p = 0,2$). De plus, les femelles semblaient plus susceptibles à une déchire de la dure-mère (75 % femelles *versus* 25 % pour les mâles).

Pour une pression correspondante à un traumatisme sévère (D), les femelles avaient un arrêt respiratoire plus long de 76 min ($110,62 \pm 37,11$ min femelles, $n = 13$ versus $34,89 \pm 21,13$ min mâles, $n = 10$, $p = 0,55$) et un taux de mortalité près de 10 fois inférieur aux mâles (7,69 % pour les femelles et 60 % pour les mâles). Le taux de déchirure de la dure-mère était de 80 % et celui d'HSD était de 40 % pour les deux sexes. Enfin pour le groupe E (tubulure longue remplie de sérum physiologique et traumatisme sévère), les femelles avaient un arrêt respiratoire plus long d'une heure que les mâles sans différence significative ($136,60 \pm 52,48$ min femelles, $n = 8$ versus $72,60 \pm 44,67$ min mâles, $n = 5$). Les deux sexes ne présentaient pas de grand écart pour le taux de mortalité (12,5 % pour les femelles et 14,29 % pour les mâles), de lésion de la dure-mère (50 % pour les deux) et d'HSD (25 % pour les femelles et 20 % pour les mâles). **Nous avons décidé de combiner les données des deux sexes pour comparer les groupes entre eux.**

Aucune différence n'est observée entre les groupes pour le temps de l'arrêt respiratoire post-TC (Kruskal-Wallis, $p = 0,088$). La tubulure avec l'air (B) occasionnait un taux élevé de mortalité de 50 % ($n = 10$) par rapport au groupe C avec du sérum physiologique (25 %, $n = 8$). Le décès des animaux du groupe B était immédiat après le TC (moins d'une minute) par un collapsus cardiaque, et était plus tardif pour le groupe C ($113,50 \pm 96,50$ min) dont le décès était plutôt associé à une déficience cardiorespiratoire. Le taux de mortalité des groupes LFP, D (pression sévère de 4,6 atm) et E (tubulure longue à haute pression délivrée) était proche de 36,36 % ($n = 11$), 30,44 % ($n = 23$) et 13,13 % ($n = 14$, respectivement). **Nous avons éliminé le paramètre « tubulure avec de l'air » car la mortalité survenait en moins d'une minute et son taux était de 50 %. Le groupe E présentait une faible mortalité ce qui est en adéquation avec les valeurs de l'éthique animale.**

L'augmentation de la pression induisait une tendance à des conséquences physiologiques plus sévères avec un arrêt respiratoire long ($31,13 \pm 8,51$ min groupe C, $n = 7$ versus $83,87 \pm 26,08$ min groupe D, $n = 23$), une augmentation du taux de déchirure de la dure-mère de (50 % groupe C versus 82,61 % groupe D) et donc de la fréquence des hernies cérébrales. La déchirure de la dure-mère étant un point limite pour nos expériences avec réveil, il conduit au décès de l'animal. **Nous n'avons donc pas conservé la tubulure courte avec une pression sévère.**

Les rats du groupe E (tubulure longue et sévère) avaient un taux d'hématome sous-dural plus élevé (64,28 %, $n = 14$) que le groupe LFP (54,55 %, $n = 11$) et le groupe C (50 %, $n = 8$). Les trois groupes présentaient une fréquence de lésions de la dure-mère équivalente entre 36,36 % (LFP) et 50 % (groupes C et E). Cependant, la pression de l'onde de choc était basse et le temps de décroissance court pour le groupe C. **Nous avons décidé de garder le groupe E (tubulure longue et forte pression**

délivrée) pour comparer les variations directes lors du TC et la rupture de la barrière hémato-encéphalique 6 h post-TC.

L'apparition de DCE spontanées est un critère de sévérité du TC. Les DCE sont apparues dans les 5 groupes, mais particulièrement chez les animaux présentant de graves lésions post-TC comme une déchirure de la dure-mère et/ou un hématome sous-dural. Une déchirure de la dure mère et donc d'une hernie étaient présentes chez 66,67 à 100 % des animaux avec au moins une DCE pour les 5 groupes. Une HSA était présente chez 33 % (groupe D et E), 50 % (groupe LFP) et 100 % (groupes B et C) des animaux présentant au moins une DCE. **L'apparition de DCE spontanées a donc surtout été observée chez des animaux présentant une agression supplémentaire comme une rupture de la dure-mère, une hernie cérébrale, ou un hématome sous-dural. Il est donc difficile d'attribuer l'apparition des DCE au TC seul.**

Lors du prélèvement des cerveaux, le tronc-cérébral des animaux décédés après un traumatisme était couvert de sang suggérant d'une hémorragie sous-durale. Une compression à ce niveau pourrait-être à l'origine des arrêts respiratoires transitoires.

Tableau XI. Séquelles physiologiques après l'induction du traumatisme crânien chez le rat.

Groupe	Arrêt respiratoire [†] (min)	Taux mortalité (%) Temps post-TC (min)	Lésion dure-mère (%)	HSD (%)	DCE positive [‡] (%)	DCE - lésion dure-mère [§] (%)	DCE – HSD [§] (%)
LFP (A)	♀ (n = 3)	257,40 ± 128,60	0	66,67	33,33	100	0
	♂ (n = 8)	0,5 ± 0,25	50 (33,50 ± 28,90)	50	12,5	100	100
	Total (n = 11)	77,58 ± 51,41	36,36 (33,50 ± 28,90)	36,36	54,55	18,18	100
B	♀ (n = 4)	36,33 ± 13,30	25 (< 1)	75	33,33	100	100
	♂ (n = 6)	8,00 ± 3,00	66,67 (< 1)	50	0	0	0
	Total (n = 10)	25,00 ± 10,10	50 (< 1)	20	60	20	100
C	♀ (n = 4)	32,75 ± 11,29	25 (210)	50	25	100	0
	♂ (n = 4)	27,50 ± 14,34	25 (17)	50	33,33	100	100
	Total (n = 8)	30,13 ± 8,51	25 (113,50 ± 96,50)	50	28,57	100	50
D	♀ (n = 13)	110,62 ± 37,11	7,69 (24)	84,62	53,85	85,71	28,57
	♂ (n = 10)	34,89 ± 21,13	60 (118,80 ± 32,24)	80	62,50	100	40
	Total (n = 23)	79,64 ± 24,51	30,44 (136,10 ± 32,35)	82,61	39,13	57,14	91,67
E	♀ (n = 8)	136,60 ± 52,48	12,5 (180)	50	25	100	50
	♂ (n = 6)	72,60 ± 44,67	14,29 (< 1)	50	20	0	0
	Total (n = 14)	112,0 ± 36,40	13,33 (90,50 ± 89,50)	50	23,08	66,67	33,33

† Les animaux morts 30 min après induction du TC et sans reprise de la respiration ont été exclus.

‡ Inclus seulement les animaux vivants 60 min post-TC.

§ Sur le nombre total des animaux avec au moins une DCE positive.

TC : traumatisme crânien ; **HSD** : hématome sous-dural ; **DCE** : dépolarisation corticale envahissante ; ♀ : femelle ; ♂ : mâle. **LFP (A)** : appareil à percussion latéral de fluide à 5,37 atm – tubulure longue avec sérum physiologique ; **B** : valve pneumatique à 8 ms et 3,82 atm – tubulure courte air de l'air ; **C** : valve pneumatique à 8 ms et 3,32 atm – tubulure courte avec sérum physiologique ; **D** : valve pneumatique à 8 ms et 4,62 atm – tubulure courte avec sérum physiologique ; **E** : valve pneumatique à 16 ms et 4,16 atm – tubulure longue avec sérum physiologique. Moyenne ± SEM.

I.3.2.c. Fréquences cardiaques et flux sanguin cérébral lors du traumatisme crânien

Lors de l'induction du TC, la fréquence cardiaque des animaux des deux groupes (LFP et groupe E, valve pneumatique avec une tubulure longue et une pression élevée) s'accélérait instantanément au moins pendant plus de 30 sec. Cependant, l'impact provoquait une cyanose transitoire de 3 à 5 min chez tous les rats induisant une altération du signal de l'oxymètre de pouls qui a souvent provoqué un arrêt transitoire du monitoring de l'oxymétrie. Le rythme cardiaque s'était accéléré dans les deux groupes après le TC sans différence entre les deux groupes (ANOVA 2 voies, $p = 0,002$). Le groupe E a eu une accélération du rythme cardiaque de $14,52 \pm 4,78$ bpm par rapport à la fréquence basale de $387,2 \pm 8,54$ bpm (**Figure 46.A**, post-hoc de Bonferroni, $p = 0,17$, $n = 7$). Concernant le groupe LFP, la fréquence cardiaque basale était de $400,3 \pm 19,17$ bpm et de $420,2 \pm 21,13$ bpm après le TC (post-hoc Bonferroni, $p = 0,028$, $n = 2$).

Le flux sanguin cérébral mesuré au niveau du cortex temporal ipsilatéral au traumatisme diminuait au cours des 60 s post-TC dans les deux groupes. Les animaux du groupe G4 ont eu une perte de $76,21 \pm 2,84$ % (test de Student apparié, $p < 0,001$, $n = 7$), et de 58,12 et 82,30 % pour les deux rats LFP. Un rebond à 30 s est observable chez les rats LFP causé par le branchement de la canule trachéale au respirateur artificiel (**Figure 46.B**). La diminution du débit sanguin cérébral serait liée d'une part à l'infiltration de sérum physiologique dans la cavité épidurale éloignant et comprimant les vaisseaux sanguins du laser Doppler mais également à des lésions des vaisseaux au niveau ventrolatéral (cortex tempo-pariétal et néocortex).

Les deux méthodes induisent une augmentation de la fréquence cardiaque au court des 30 s après le TC et d'une forte baisse du flux sanguin cérébral dans le cortex temporal ipsilatéral au choc.

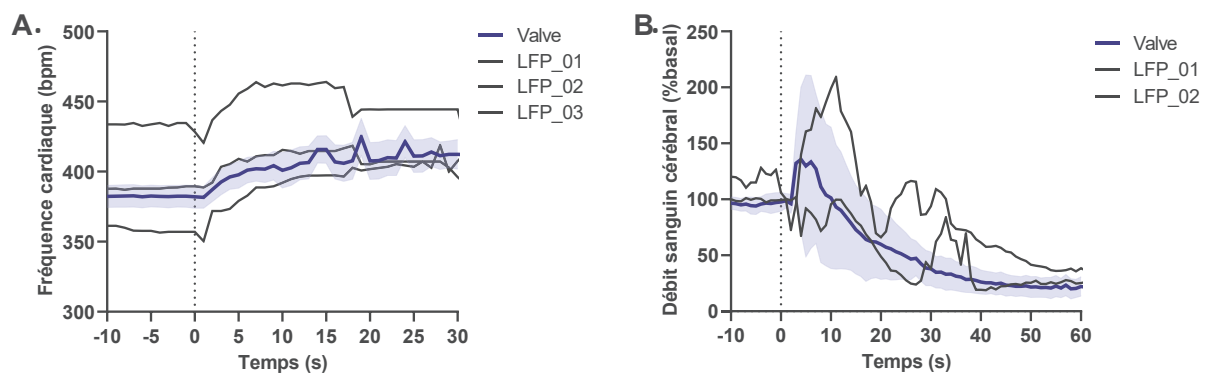


Figure 46. Changement rapide des paramètres physiologiques après un traumatisme crânien. Variation de la fréquence cardiaque (A) et de la variation du débit sanguin cérébral (B) lors de l'induction du TC par la valve pneumatique (groupe E, valve pneumatique avec une tubulure longue et une pression élevée administrée, moyenne \pm SEM, n = 7) ou le LFP (individuel, n = 3 ou 2).

1.3.2.d. Ouverture de la barrière hémato-encéphalique six heures après TC

L'ouverture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) est une des premières conséquences histologiques du TC. La perméabilité de la BHE a été observée par l'infiltration de bleu d'Evans dans le parenchyme cérébral. Les animaux sham présentaient un marquage superficiel du cortex pariétal, à l'endroit de la craniotomie. La coloration est également observable chez les deux groupes TC, par la valve pneumatique et par LFP. Les couches corticales superficielles ont été blessées par l'acte chirurgicale. De plus, la présence de bleu d'Evans se retrouve dans le cortex temporal ipsilatéral au traumatisme et au niveau du plexus choroïde. Une hémorragie s'est également formée dans le corps calleux sous-jacent au cortex pariétal ipsilatéral au choc (AP : -3,90 mm) et au cortex temporal dans le parenchyme et entre le ventricule et le corps calleux. Cette dernière est visible jusqu'en -6,40 mm en postérieur (Figure 47).

En conclusion, les lésions de la BHE sont comparables entre les deux modèles de TC par le LFP ou la valve pneumatique.

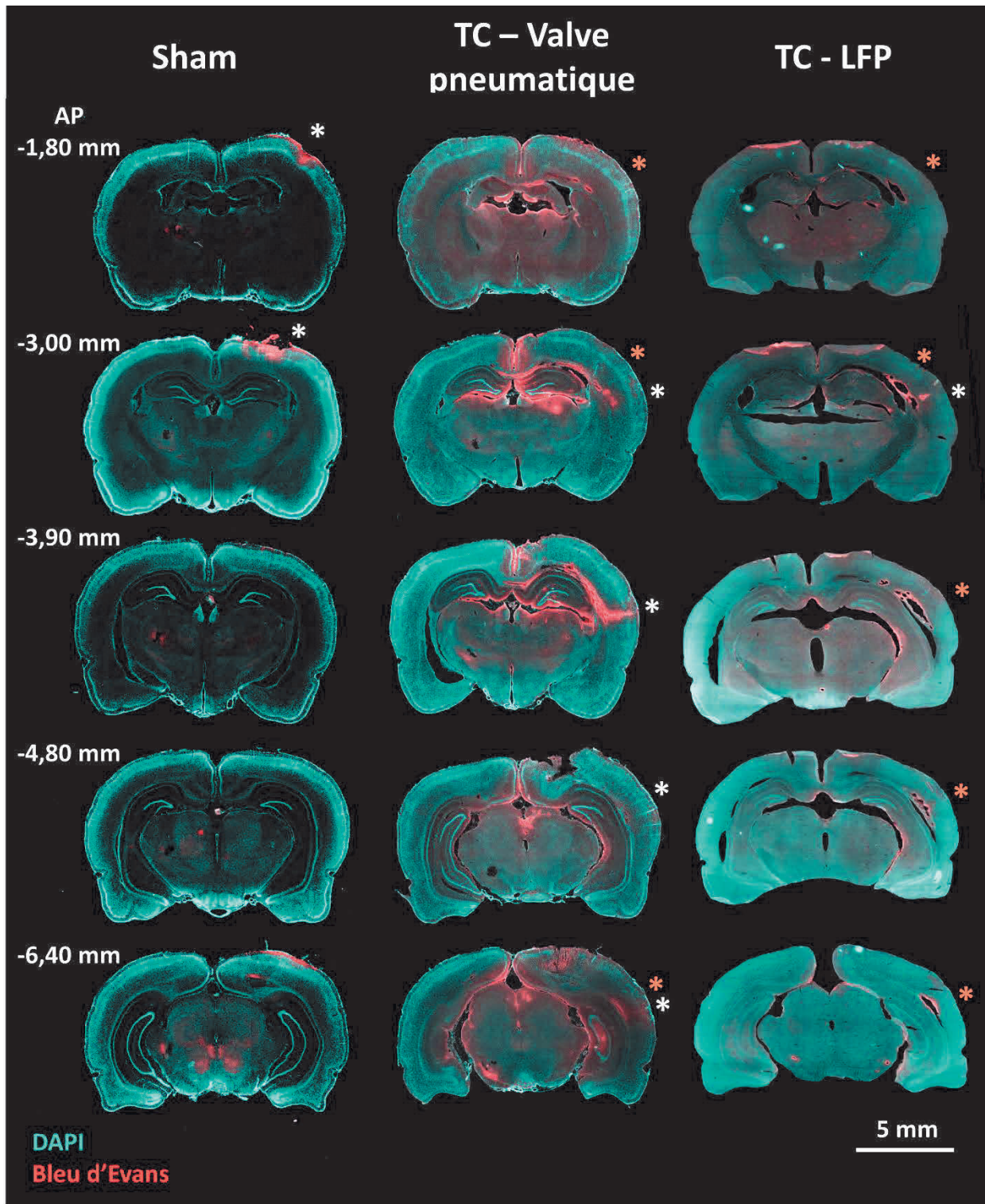


Figure 47. Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique 6 h post-traumatique. La fuite de bleu d'Evans (rouge) dans le cortex pariétal au site d'impact et temporal ipsilatéral (astérisque blanc) était clairement visible chez les animaux traumatisés par la valve pneumatique ou par l'appareil de percussion latérale de fluide (LFP). Une hémorragie au niveau du corps calleux et du ventricule avec une cavitation (astérisque orange) étaient également visibles pour ces animaux. Coloration des noyaux avec du DAPI (bleu). Axe rostro-caudal, TC : traumatisme crânien.

I.4. Conclusion

L'objectif initial de ces travaux était de remplacer l'appareil d'induction du TC, le LFP, par la valve pneumatique. Les avantages de cette méthode sont une calibration ajustable et fiable, un moindre encombrement spatial avec une facilité et une rapidité d'installation. Ce choix doit également être pris en fonction de l'éthique animale, afin de limiter au maximum les décès expérimentaux.

Nous avons calibré le temps d'ouverture de la valve, la longueur de la tubulure reliant la valve pneumatique au crâne de l'animal et la pression imposée afin de reproduire fidèlement le profil d'onde de choc induit par la méthode de LFP. Les animaux présentaient un temps d'arrêt respiratoire, un taux de mortalité et de présence d'hématome, une variation de la fréquence cardiaque et du flux sanguin cérébral, ainsi qu'une rupture de la BHE comparables. Cependant, en dépit de ces ajustements, la valve pneumatique provoquait des lésions de la dure-mère plus fréquemment. L'utilisation de la valve pneumatique n'était donc pas avantageuse et nous avons choisi de garder le modèle LFP, en ajoutant toutefois une tubulure pour relier le cylindre rempli de sérum physiologique au crâne de l'animal. Ceci limite le déplacement de l'animal, permet de diminuer le temps de préparation et de suivre les données physiologiques en continu, notamment lors du TC. Le dispositif du LFP a donc été utilisé de cette manière dans la suite de ces travaux pour caractériser un modèle de TC sévère.

Du fait de la sévérité, un cadre éthique et un suivi du bien-être animal a été imposé et a donné lieu à l'étude qui est présentée dans la partie suivante.

II. Développement d'une grille d'évaluation du bien-être animal spécifique pour le modèle de traumatisme crânien sévère chez le rat

II.1. Avant-propos de article

Contexte de l'étude

Le traumatisme crânien (TC) est l'une des principales causes de décès et d'invalidités dans le monde. Chez l'homme, l'échelle de score de Glasgow est utilisée pour définir l'état de conscience des patients et la sévérité du TC, de légère, modérée à sévère. Parmi 69 millions d'individus touchés dans le monde chaque année, une estimation de 5,48 millions souffrent de TC sévère (Dewan et al., 2018). Ces patients présentent un taux de mortalité élevé (Roozenbeek, Bob et al., 2013) et souffrent de blessures complexes et multifactorielles. Des lésions primaires apparaissent immédiatement après le TC, et évoluent au cours des heures, des semaines ou des années en lésions secondaires (Kaur & Sharma, 2018; Prasetyo, 2020). Ces lésions impliquent non seulement le cerveau, mais aussi les fonctions respiratoire, cardiovasculaire et immune (Masel & DeWitt, 2010). En conséquence, le TC est difficile à modéliser *in vitro*, dans des cultures cellulaires ou des explants de cerveau, ce qui impose de mener des recherches *in vivo*, chez l'animal (Bonder et al., 2018). L'utilisation éthique d'animaux de laboratoire pour modéliser les maladies humaines exige que les avantages de cette approche soient soigneusement évalués par rapport aux dommages potentiels causés aux animaux. Dans la recherche sur les TC, les préoccupations éthiques sont particulièrement importantes dans le cas des blessures sévères, pouvant induire une souffrance chez l'animal. En outre, les laboratoires basés sur la recherche animale, dans le monde entier, se sont engagés à respecter l'approche dite des 3R (Russell & Burch, 1959) et doivent se conformer à leur réglementation nationale (Bayne et al., 2013; Vasbinder et al., 2014). De plus, une mauvaise gestion du bien-être animal est susceptible d'induire des biais scientifiques. Il est donc nécessaire d'estimer avec précision le bien-être des animaux après un TC. Les premières tentatives de quantification du bien-être ont été développées dans les années 1980 (Montgomery, 1987; Morton & Griffiths, 1985) en utilisant des critères comportementaux et physiologiques tels que le poids, la fonction cardio-respiratoire et l'apparence générale. Les grilles d'évaluations du bien-être animal sont devenues ensuite de plus en plus spécifiques à l'espèce animale et au modèle pathologique étudiés. Des scores de sévérité pour l'évaluation du bien-être ont été développés, par exemple, pour définir les points limites en toxicologie ou en oncologie. Plus récemment, une grille de score spécifique a été proposée pour les lésions cérébrales (Pinkernell et al., 2016). Cependant, la recherche du TC manque de fiches d'évaluations adaptées.

Objectif de l'étude

Nous présentons ici une grille d'évaluation du bien-être animal après un TC sévère, qui comprend non seulement des indices généraux de bien-être, mais aussi des caractéristiques plus spécifiques au TC. Cette grille de score a été utilisée pour décrire le bien-être des animaux jusqu'à 160 jours après un TC sévère induit par la méthode de percussion latérale de fluide (LFP, *lateral fluid percussion*), et a servi de base à la définition des points limites.

Principales méthodes utilisées

Nous avons utilisé un modèle de TC sévère chez des rats mâles et femelles provoqué par un appareil LFP connecté à une tubulure. La pression induite était de 5 atm. Les animaux étaient intubés, au préalable, et une attention particulière a été portée sur l'arrêt respiratoire et l'état général des animaux.

Le niveau de l'état de conscience des animaux post-TC a été évalué et suivi à l'aide de la grille de score de coma de Tübingen-Boston (Pais-Roldan et al., 2019).

Le bien-être animal était suivi quotidiennement par trois expérimentateurs pendant 28 jours en utilisant une grille développée et décrite dans cet article, puis jusqu'à 160 jours par un seul expérimentateur. La mise à mort éventuelle des animaux a été envisagée après une discussion régulière avec la vétérinaire référente de notre laboratoire. Une seconde grille a été utilisée pendant les 2 premières semaines afin de la comparer à la nôtre (Pinkernell et al., 2016).

Principaux résultats

- Les animaux présentaient une souffrance transitoire de 4 jours suite à l'induction du TC sévère, et ont retrouvé un score normal en 10 - 15 jours.
- Les scores de bien-être chez les femelles étaient plus élevés, impliquant une souffrance plus prononcée, que chez les mâles. Cette différence pourrait être liée à la morphologie de la boîte crânienne des femelles.
- Les scores des trois expérimentateurs présentaient une haute corrélation.
- Notre grille est adaptée pour le modèle de TC sévère par des points limites ajustés permettant d'éviter la mise à mort d'animaux destinés à retrouver un niveau de bien-être dit « normal ».

II.2. Article

Animal welfare after severe traumatic brain injury in rats

Clélia Allioux, Laëtitia Achaintre, Fatima Cheatani, Baptiste Balança, Stéphane Marinesco

En soumission

ANIMAL WELFARE AFTER SEVERE TRAUMATIC BRAIN INJURY IN RATS

Clélia Allieux^{1,2}, Laëtitia Achaintre³, Fatima Cheataini¹, Baptiste Balança^{1,4},
Stéphane Marinesco^{*1,5}

1 INSERM U1028, CNRS UMR5292, Team TIGER, Lyon Neuroscience Research Center, Bron, France

2 Claude Bernard Lyon 1 university, Lyon, France

3 Neurocampus Animal Housing, Lyon Neuroscience Research Center, Bron, France

4 Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

5 AniRA-BELIV Technological Platform, Lyon Neuroscience Research Center, Bron, France

***Corresponding author:** Dr Stéphane Marinesco

Team TIGER, AniRA-BELIV technological platform,

Lyon Neuroscience Research Center,

95 boulevard Pinel, 69675 Bron Cedex, France

E-mail: stephane.marinesco@univ-lyon1.fr

Phone: (33) 481 10 65 60

ABSTRACT

Severe traumatic brain injury (TBI) is a multifactorial injury process involving respiratory, cardiovascular, and immune functions in addition to the brain. Thus, live animal models are needed to study the molecular, cellular, and systemic mechanisms of TBI. The ethical use of laboratory animals requires that the benefits of approaches be carefully weighed against potential harm to animals. Welfare assessments adapted to severe TBI research are lacking. Here, we introduce a scoresheet that includes general welfare (body weight, general appearance, and spontaneous behavior) and TBI-specific (respiratory function, pain, locomotor impairment, and wound healing) indices. Implementation of this scoresheet in rats subjected to severe lateral fluid percussion (LFP) TBI revealed a four-day period of probably suffering followed by a recovery to normal welfare scores within 10–15 days, with females showing a worse impact than males. The scores indicate that animal suffering in this model is only transitory and the scoresheet allows for the implementation of refinement measures including (1) analgesia during the initial period of suffering and (2) humane endpoints set (30% weight loss, score ≥ 90 , and/or respiratory problems). This animal welfare scoresheet tailored to TBI research provides a basis for further refinement of animal research paradigms aimed at understanding or treating the sequelae of severe TBI.

Keywords: Traumatic brain injury, rat welfare scale, humane endpoint, ethical use of animals in research

INTRODUCTION

Traumatic brain injury (TBI) is a leading cause of death and disability worldwide. In humans, the Glasgow Coma Scale is used to classify patients' state of consciousness and TBI severity, ranging from mild to moderate and severe. Among the 69 million people affected by TBI each year worldwide, an estimated 5.48 million suffer from severe TBI.¹ Such patients suffer from complex and multifactorial injuries and they have a high mortality rate.²

Primary injuries are apparent immediately after a TBI has been sustained, and then evolve over hours, weeks, or even years.^{3,4} In addition to brain changes, TBI can also affect respiratory, cardiovascular, and immune functions.⁵ Consequently, TBI is difficult to model in vitro, in cell cultures, or in brain explants, and in vivo animal research is warranted.⁶ The ethical use of laboratory animals requires that the benefits of the approach be carefully weighed against potential harm to animals. In TBI research, ethical concerns are especially relevant to severe TBI, after which animals may experience suffering. Animal research laboratories worldwide have committed to the three Rs—replacement, reduction, and refinement⁷—and they are additionally required to abide by national regulations.^{8,9} Moreover, poor management of animal welfare is likely to induce scientific bias. Thus, for both ethical and scientific reasons, it is important to assess animal welfare after TBI accurately.

The first attempts to quantitate animal welfare developed in the 1980s were based on general behavioral and physiological criteria, such as body weight, cardio-respiratory function, and general appearance.^{10,11} Since then, animal welfare scoresheets have become increasingly specific to species and the pathology being modeled. Severity scoring rubrics have been developed for use in welfare assessment and to define humane endpoints in toxicology or cancer research. Although a brain injury-specific scoresheet has been proposed¹², specific scoring grids adapted to TBI research are lacking.

Here, we introduce a scoresheet designed to monitor animal welfare following TBI that includes both general welfare indices and TBI-associated characteristics. This scoresheet was used to describe animal welfare for a period of up to 160 days after severe TBI induced by the lateral fluid percussion method (LFP). Observations documented via the scoresheet provided a basis for the definition of humane endpoints.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Forty-two female and male adult Sprague-Dawley rats were divided into sham (N = 19) and TBI groups (N = 23). Experimental protocols were approved by the University committee on animals in research (no. APAFIS#10019-201704211705870). Severe TBI was induced with an LFP apparatus that was set to generate a 20-ms, 5-atm pulse to the dura (see supplementary methods). Sham animals underwent a similar surgery without percussion. Animal consciousness was assessed with the Tübingen-Boston Rat Coma Scale (RCS).¹³

Post-TBI welfare scoresheet

An 11-item welfare scoresheet (Fig. 1) developed in our laboratory was completed daily for the first 28 days post-TBI. It is composed of three sections: remote observations (4 items), observations made during close observation/handling (3 items), and physiological parameters (4 items). General (physical appearance, social contact, interaction with the experimenter and objects, and body weight)¹¹ and TBI-related (Rat Grimace Scale pain assessment¹⁴, ventilation and cyanosis, locomotion, hydration, body condition¹⁵, mouth injury, and post-surgical sequelae) items were incorporated in the scoresheet sections (see supplementary methods).

Four score-based welfare stages were defined: 0–10, good physical condition and absence of pain; 11–60, possible discomfort or pain, triggering increased monitoring and adapted corrective measures, including subcutaneous 50-mg glucose injection and/or appetitive food 3-4 times/day (if weight loss > 5% or dehydration), buprenorphine injection (0.02 mg/kg, subcutaneous) for pain or injury; 61–89, substantive pain and probable general suffering, triggering veterinarian advice; and ≥90, humane endpoint triggering euthanasia. Incisor growth sometimes induced malocclusion in severe-TBI rats, necessitating surgical filing under anesthesia, repeated every 3 days until resumption of normal wear.

Endpoints

Two peri-operative endpoints were defined: dural tear; and respiratory failure requiring mechanical ventilation for >45 min. Subsequently, a veterinarian indicated if euthanasia was warranted based on daily interaction.

Data analysis

Data are expressed as median [interquartile range]. Groups were compared with Mann-Whitney U tests. Two-way ANOVAs for sex and TBI were conducted; if a significant interaction between sex and TBI was detected, a Mann-Whitney U post-hoc test adjusted by the Bonferroni method was applied to determine significance ($p < 0.05$, see supplementary methods).

Table I. Scoresheet for severe traumatic brain injury

Score interpretation levels are as follows:

0–10 Normal physical condition, no pain

11–60 Presence of discomfort indicating a need for sustained observation and increased monitoring (up to 3–4 times/day), moistened, palatable food, analgesia, and subcutaneous saline or glucose.

61–89 Significant suffering and pain indicating a need for compensatory measures, subcutaneous glucose, veterinary advice.

≥90 Severe suffering indicative of a humane endpoint.

T0 = pre-surgery weight, Tx = daily weight.

Animal ID: _____ Date/hour of surgery: _____
 Protocol: _____ Group: _____ Pre-surgery body weight (g): _____

		Date / hour	
REMOTE OBSERVATION			
General condition, appearance	Well groomed	0	
	Lack of grooming, slight presence of porphyrin on the eyes	2	
	Piloerection, unkempt fur, marked porphyrin stains	10	
Grimace scale	Normal	0	
	Moderate signs	10	
	Severe signs	15	
Breathing rate	Normal	0	
	Dyspnea, hypoventilation	10	
	Difficult and marked, cyanosis	90	
Spontaneous behavior	Normal social interaction	0	
	Reduced social interaction	2	
	Refuses social interaction, completely isolated	5	
EXAMINATION DURING HANDLING			
Reaction to handling	Normal curiosity, approaches experimenter	0	
	Slightly reluctance to contact	5	
	Prostration, apathy, avoids contact	10	
	Total paralysis (>2 days), pre-comatose, lethargy	90	
Locomotion / gait	Normal gait	0	
	Slight loss of balance, skims over the ground	2	
	Strong loss of balance, atonic	10	
Interaction with environment, enrichment	Normal use of enrichment, nesting	0	
	No use of enrichment, no nesting behavior	5	
PHYSIOLOGICAL PARAMETERS			
Mouth injury, post-surgical sequelae	No sign of infection, clean wound	0	
	Benign malocclusion, scratches around the scar	5	
	Severe malocclusion, injury to mouth and lips, absence of wound healing	10	
	Irreversible infection spread, purulence.	90	
Hydration (skin pinch)	Normal < 1 s	0	
	≤ 2 s	5	
	> 2 s	10	
Body condition scoring	Good	0	
	Fair	5	
	Emaciated	10	
Body weight loss % $\frac{T_0 - T_x}{T_0} \times 100$	Body weight (g)		
	0 – 5	0	
	6 – 10	2	
	11 – 15	5	
	16 – 20	10	
	20 – 25	15	
	26 – 29	20	
≥ 30	90		
Total:			

Notes (evolution injury, seizure, immobility...):

RESULTS

1. Severe TBI induction and acute recovery

Although LFP induction produced a similar 5 atm shockwave in the water column, the peak pressure diminished at the level of the dura to a lower value in males (2.5 [2.4–2.6] atm) than in females (2.7 [2.6–2.8] atm, $p = 0.006$). One female and four males had a tear in the dura and were euthanized. Spontaneous mortality rate was low (1/18), probably due to respiratory assistance.

Relative to sham animals (N = 19; 10 females), the remaining TBI animals (N = 15; 8 females) required an extended surgery-recovery time, as indicated by hindpaw withdraw reflex (36.0 [18.0–72.0] min vs 0 in sham animals) righting reflex (3.0 [0.0–30.0] vs. 84.0 [51.0–90.0] min, $p < 0.001$), and RCS normalization (5.0 [5.0–10.0] vs. 100.0 [75.0–115.0] min, $p < 0.001$) (Fig. 1A-D). Immediately after TBI, we observed a 10~30-s respiratory arrest and abnormal heart rhythms (tachycardia and bradycardia) with cyanosis for about 5 min.

Female rats took more time to recover their righting reflex (100.0 [82.5–145.0] min) than males (5.0 [40.0–150.0], $p < 0.001$), and showed a trend toward a longer hindpaw withdrawal reflex recovery (females, 57.0 [26.25–73.50] min; males, 34.0 [10.0–46.0] min; $p = 0.088$). Finally, 73.3% of TBI rats had a subdural hematoma (4/8 females and all males). These observations indicated severe TBI.

2. Evolution of animal welfare score

Welfare scores of TBI animals worsened (increased) dramatically during the first 1–2 days postoperatively and then improved (decreased) gradually thereafter until reaching stable basal values within two weeks (Fig. 2E). Sham animals had only a slight worsening in welfare scores on the day after surgery. The first-12-days area under the curve for welfare scores was significantly elevated in the TBI group (428.0 [233.5–539.5]) compared to the sham group (46.0 [29.0–65.0], $p < 0.001$, Fig. 2F). Welfare scores returned to <10 within 2.0 [0.0–1.0] days in sham animals, but took 12.0 [6.0–20.0] days to do so in TBI animals ($p \leq 0.0007$).

Welfare worsening following TBI was attributable to virtually all scoresheet items (see supplementary Table). Compared to sham animals, TBI animals took longer to recover a silky coat (7.0 [4.0–13.0] vs. 1.0 [1.0–3.0] days, $p \leq 0.0044$) and had more days with probable pain (grimace scale ≥ 10 during 7.5 [3.75–14.5] vs. 0.0 [0.0–1.0] days, $p \leq 0.0083$), dyspnea (2.0 [2.0–3.0] vs. 0.0 [0.0–1.0] days, $p \leq 0.0122$), abnormal responses to handling (3.0 [2.0–5.0] vs. 0.0 [0.0–1.0] days, $p \leq 0.0023$), and impaired locomotion (6.0 [3.0–10.0] vs. 0.0 [0.0–0.0], $p < 0.0002$). TBI animals had greater maximal weight loss than sham animals (15.4 [11.1–22.6] vs. 3.32 [5.39–1.47] %, $p \leq 0.0052$, Fig. 2G), and took a couple

weeks to normalize (Fig. 2H). Finally, dehydration paralleled the changes observed in body weight, lasting 6–15 days in TBI animals, versus 0–2 days in sham animals ($p \leq 0.0038$).

Female rats experienced longer welfare deficits than their male congeners. They took longer to return to normal coat appearance than males (10.5 [7.0–27.75] days females, 4.0 [3.0–8.0] days males, $p = 0.015$). Dehydration was impacted longer (15.5 [9.0–23.3] days female vs 7.0 [4.0–8.0] days male, $p = 0.0065$). Moreover, body condition (thinness, 12.5 [9.0–23.5] days) and interaction with the environment (1.0 [0.25–2.75] day), was significantly impacted in females only, compared to sham animals ($p < 0.0001$, and $p = 0.0015$ respectively). Finally, female rats recovered their pre-injury weight on day 17.0 [12.0–27.5], significantly later than males (day 10.0 [4.0–12.0], $p = 0.006$). At 160 days post-surgery, no significant difference between sham and TBI animals could be evidenced. Overall, our approach demonstrated that suffering or pain lasted less than two weeks.

Our welfare score sheet was validated across three evaluators with different levels of education and lab experience [intraclass correlation coefficients, 0.89 (0.88–0.91)].¹⁶ Applying an alternative welfare scale used for brain injury¹², 13/15 TBI animals (8 females) that recovered normal welfare scores within two weeks reached a score that would have triggered euthanasia (Fig. 2I).

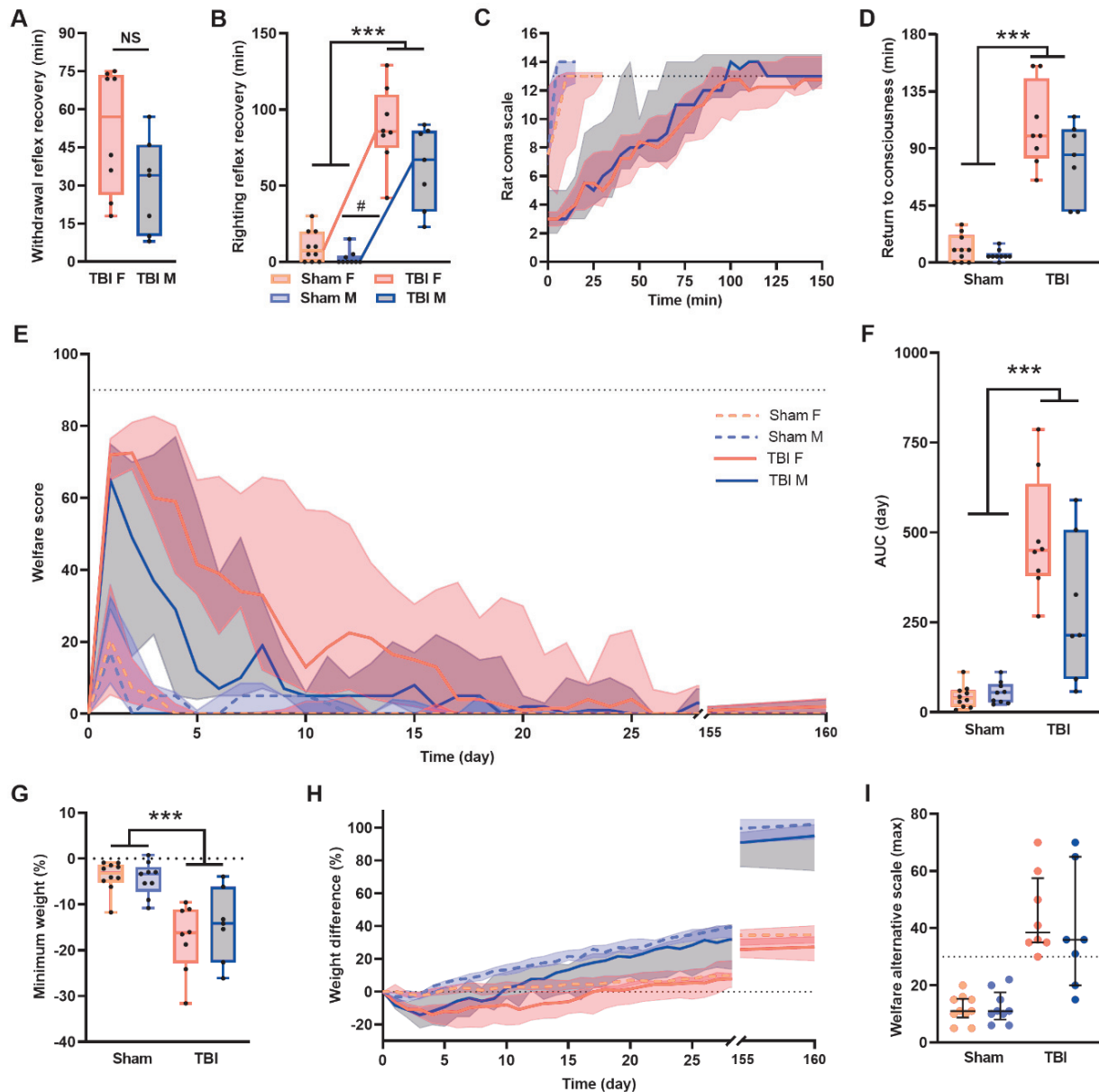


Figure 1. Animal welfare after severe traumatic brain injury. Hindpaw withdrawal reflex (A) and righting reflex (B) recovery after TBI. (C) Evolution the Rat Coma Scale (RCS) score after severe TBI. Scoring began when animals recovered the hindpaw withdrawal reflex from anesthesia. The dotted line is the mean maximum score obtained in sham rats. (D) Time to return to full consciousness assessed by the RCS. Return to full consciousness took about 1h30 after severe TBI. (E) Evolution of the TBI welfare score in sham and experimental animals. The horizontal line is the threshold score corresponding to humane endpoint. (F) Area under curve of welfare score during the first 12 days. (G) Minimum percent weight loss over the first 10 days and (H) changes in weight during one month after TBI expressed. (I) Animal welfare evaluated by an alternative scale not tailored for TBI.¹² The dotted line represents the endpoint triggering euthanasia. Values are shown as median [IQR]. Sham females (F) $n = 10$, TBI F $n = 8$, sham males (M) $n = 9$, TBI M $n = 7$. NS non-significant, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

DISCUSSION

The presently introduced welfare scoresheet was developed specifically for assessing animal suffering after severe TBI. It includes general wellbeing items, such as weight, hydration, fur condition, and interactions with conspecifics, experimenters and toys, as well as TBI-associated items, such as respiratory function, gait, and the presence of wounds. The LFP method often induces transient respiratory dysfunction¹⁷ and mimics systemic complications in human patients.¹⁸⁻²⁰ Gait deficits in TBI models parallel motor deficits²¹⁻²³ and immobility/paralysis²² in human patients. TBI model rats should be monitored for the presence of wounds, excessive incisor growth, reduced food intake, weight loss, and a poor general condition. This scoresheet was implemented with a high degree of correlation across evaluators.

Welfare scores took longer to normalize for females than males, including a longer lasting impact on grooming behavior and body weight. A meta-analysis of clinical studies suggested women may fare worse than men following mild–moderate TBI, but may fare better than men following severe TBI.²⁴ Females have been reported to fare better than males in some animal models.²⁴⁻²⁶ Prior examination of sex differences in outcomes of moderate-injury LFP model rats have revealed higher mortality but smaller contusions in females.²⁷⁻²⁹ Here, worse outcomes in females were associated with a higher pressure applied to the dura, suggesting that biomechanical factors, such as a smaller cranium, may underlie the presently observed sex differences.

Notably, we observed rapid recovery to normal welfare scores within two weeks of LFP. Severe TBI was demonstrated by loss of consciousness for >1 h, respiratory arrest lasting 10–30 s with cyanosis, and heart rate modifications lasting ~5 min. The transience of effects on welfare scores in our rats differs from the long-term cognitive problems and disability found in 60–65% of patients with severe TBI^{2, 30}, perhaps due to a higher degree of neuroplasticity and neurogenesis^{31, 32} as well as accelerated timescales of metabolic, inflammatory, and axonal dysfunctions in rodents.³³ Our study was limited to welfare assessment, and thus we did not track behavioral deficits or neurological lesions that might persist beyond 160 days.

Data collected with this welfare scoresheet can provide information relevant to the ethical justification of animal use in TBI research. Careful rating of procedures in terms of animal welfare and injury severity is needed to clarify benefits to society versus hardship for animals. The present data demonstrate that LFP-induced severe TBI does not induce long-lasting distress or suffering, supporting a justified use of rodents in TBI research. Our scoresheet is also helpful for defining precise humane endpoints for animals with severe TBI in accordance with the 3R criteria.⁷ We propose that a weight loss trigger for euthanasia be 30% rather than the common 20% limit^{12, 34} because 20~30% weight loss

is common in moderate-to-severe TBI³⁵, and in our study, animals that lost up to 30% of their body weight recovered their normal weight within two weeks if other welfare indicators were improving. This higher limit would prevent unnecessary euthanasia and thus could reduce the total number of animals used in TBI projects. Other humane endpoints are respiratory dysfunction, total paralysis, irreversible infection, untreatable wounds, and a total score of ≥ 90 on our welfare scoresheet.

CONCLUSION

This study proposes a reproducible and easy-to-use welfare scale adapted to severe TBI in rodents. In addition to providing semi-quantitative estimates of animal welfare to refine TBI models, this scoresheet demonstrated that animals recover normal welfare within less than two weeks, and that substantive suffering is only transitory.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CA and SM designed the welfare scoresheet. CA performed in vivo experiments. CA, LA and FC scored animals and retrieved data. CA, SM and BB contributed to the design of statistical analyses. CA and SM wrote the manuscript, with contributions made by all of the other authors.

ACKNOWLEDGEMENTS

CA is the recipient of a doctoral fellowship by Région Auvergne-Rhône-Alpes. Foundation Gueules Cassées "Sourire Quand Même" (grants FGC57-2020 and FGC34-2018) supported this research. We thank Mélodie Borel, Ellora Sequeira and Jenya Dursun for help with experiments and for their assistance in data collection. Thanks to Yannick Tholance for the discussions on statistics, Sophie Picavet and Manon Dirheimer for veterinarian advice.

DISCLOSURE STATEMENT

No competing financial interests exist.

REFERENCES

1. Dewan MC, Rattani A, Gupta S, et al. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2018; 1-18. 2018/04/28. DOI: 10.3171/2017.10.JNS17352.
2. Roozenbeek B, Maas AI and Menon DK. Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol* 2013; 9: 231-236. 2013/02/28. DOI: 10.1038/nrneurol.2013.22.
3. Kaur P and Sharma S. Recent Advances in Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. *Curr Neuropharmacol* 2018; 16: 1224-1238. 2017/06/14. DOI: 10.2174/1570159X15666170613083606.
4. Prasetyo E. The primary, secondary and, tertiary brain injury. *Crit Care Shock* 2020; 23: 4-13.
5. Masel BE and DeWitt DS. Traumatic brain injury: a disease process, not an event. *J Neurotrauma* 2010; 27: 1529-1540. 2010/05/28. DOI: 10.1089/neu.2010.1358.
6. Bonder DE, Keating CE, Chandra N, et al. Modeling Traumatic Brain Injury In Vitro. In: Srivastava AK and Cox CS (eds) *Pre-Clinical and Clinical Methods in Brain Trauma Research*. New York, NY: Springer New York, 2018, pp.37-69.
7. Russell WMS and Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, 1959.
8. Bayne K, Bayvel ACD and Williams V. Chapter 6 - Laboratory Animal Welfare: International Issues. In: Bayne K and Turner PV (eds) *Laboratory Animal Welfare*. Boston: Academic Press, 2013, pp.55-76.
9. Vasbinder MA, Hawk CT and Bennett BT. Chapter 3 - Regulations, Policies, and Guidelines Impacting Laboratory Animal Welfare. In: Bayne K and Turner PV (eds) *Laboratory Animal Welfare*. Boston: Academic Press, 2014, pp.17-28.
10. Montgomery CA, Jr. Control of animal pain and distress in cancer and toxicologic research. *J Am Vet Med Assoc* 1987; 191: 1277-1281. 1987/11/15.
11. Morton DB and Griffiths PH. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec* 1985; 116: 431-436. 1985/04/20. DOI: 10.1136/vr.116.16.431.
12. Pinkernell S, Becker K and Lindauer U. Severity assessment and scoring for neurosurgical models in rodents. *Lab Anim* 2016; 50: 442-452. 2016/12/03. DOI: 10.1177/0023677216675010.
13. Pais-Roldan P, Edlow BL, Jiang Y, et al. Multimodal assessment of recovery from coma in a rat model of diffuse brainstem tegmentum injury. *Neuroimage* 2019; 189: 615-630. 2019/02/02. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2019.01.060.
14. Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, et al. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain* 2011; 7: 55. 2011/08/02. DOI: 10.1186/1744-8069-7-55.

15. Hickman DL and Swan M. Use of a body condition score technique to assess health status in a rat model of polycystic kidney disease. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2010; 49: 155-159. 2010/04/01.
16. Koo TK and Li MY. A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. *Journal of Chiropractic Medicine* 2016; 15: 155-163. DOI: 10.1016/j.jcm.2016.02.012.
17. Atkinson JL, Anderson RE and Murray MJ. The early critical phase of severe head injury: importance of apnea and dysfunctional respiration. *J Trauma* 1998; 45: 941-945. 1998/11/20. DOI: 10.1097/00005373-199811000-00016.
18. Wijayatilake DS, Sherren PB and Jigajinni SV. Systemic complications of traumatic brain injury. *Curr Opin Anaesthesiol* 2015; 28: 525-531. 2015/08/19. DOI: 10.1097/ACO.0000000000000236.
19. Asehnoune K, Roquilly A and Cinotti R. Respiratory Management in Patients with Severe Brain Injury. *Crit Care* 2018; 22: 76. 2018/03/22. DOI: 10.1186/s13054-018-1994-0.
20. Holland MC, Mackersie RC, Morabito D, et al. The development of acute lung injury is associated with worse neurologic outcome in patients with severe traumatic brain injury. *J Trauma* 2003; 55: 106-111. 2003/07/12. DOI: 10.1097/01.Ta.0000071620.27375.Be.
21. Song YM, Qian Y, Su WQ, et al. Differences in pathological changes between two rat models of severe traumatic brain injury. *Neural Regen Res* 2019; 14: 1796-1804. 2019/06/07. DOI: 10.4103/1673-5374.257534.
22. Hausser N, Johnson K, Parsley MA, et al. Detecting Behavioral Deficits in Rats After Traumatic Brain Injury. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2018 2018/02/15. DOI: 10.3791/56044.
23. Yu S, Kaneko Y, Bae E, et al. Severity of controlled cortical impact traumatic brain injury in rats and mice dictates degree of behavioral deficits. *Brain research* 2009; 1287: 157-163. 2009/07/04. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.06.067.
24. Gupte R, Brooks W, Vukas R, et al. Sex Differences in Traumatic Brain Injury: What We Know and What We Should Know. *Journal of neurotrauma* 2019; 36: 3063-3091. 2019/02/23. DOI: 10.1089/neu.2018.6171.
25. Rubin TG and Lipton ML. Sex Differences in Animal Models of Traumatic Brain Injury. *J Exp Neurosci* 2019; 13: 1179069519844020. 2019/06/18. DOI: 10.1177/1179069519844020.
26. Spani CB, Braun DJ and Van Eldik LJ. Sex-related responses after traumatic brain injury: Considerations for preclinical modeling. *Front Neuroendocrinol* 2018; 50: 52-66. 2018/05/14. DOI: 10.1016/j.yfrne.2018.03.006.
27. Bramlett HM and Dietrich WD. Neuropathological protection after traumatic brain injury in intact female rats versus males or ovariectomized females. *Journal of neurotrauma* 2001; 18: 891-900. 2001/09/22. DOI: 10.1089/089771501750451811.

28. Emerson CS and Vink R. Increased mortality in female rats after brain trauma is associated with lower free Mg²⁺. *Neuroreport* 1992; 3: 957-960. 1992/11/01. DOI: 10.1097/00001756-199211000-00002.
29. Suzuki T, Bramlett HM and Dietrich WD. The importance of gender on the beneficial effects of posttraumatic hypothermia. *Exp Neurol* 2003; 184: 1017-1026. 2004/02/11. DOI: 10.1016/S0014-4886(03)00389-3.
30. Rabinowitz AR and Levin HS. Cognitive sequelae of traumatic brain injury. *Psychiatr Clin North Am* 2014; 37: 1-11. 2014/02/18. DOI: 10.1016/j.psc.2013.11.004.
31. La Rosa C and Bonfanti L. Brain Plasticity in Mammals: An Example for the Role of Comparative Medicine in the Neurosciences. *Frontiers in Veterinary Science* 2018; 5. Perspective. DOI: 10.3389/fvets.2018.00274.
32. Paredes MF, Sorrells SF, Garcia-Verdugo JM, et al. Brain size and limits to adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 2016; 524: 646-664. 2015/09/30. DOI: 10.1002/cne.23896.
33. Agoston DV, Vink R, Helmy A, et al. How to Translate Time: The Temporal Aspects of Rodent and Human Pathobiological Processes in Traumatic Brain Injury. *Journal of neurotrauma* 2019; 36: 1724-1737. 2019/01/11. DOI: 10.1089/neu.2018.6261.
34. Morton DB. A systematic approach for establishing humane endpoints. *Ilar j* 2000; 41: 80-86. 2001/06/15. DOI: 10.1093/ilar.41.2.80.
35. Eakin K, Rowe RK and Lifshitz J. Modeling Fluid Percussion Injury: Relevance to Human Traumatic Brain Injury. In: Kobeissy FH (ed) *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects*. Boca Raton (FL), 2015.

II.3. Informations supplémentaires de l'article

Animals

Rats (Envigo, France) were randomized into four groups: 10 sham females; 9 sham males; 11 TBI females; and 12 TBI males. There was no significant difference in body weight between the sham and TBI groups (females: sham 220.5 [213.3–226] g, TBI 218 [211–223] g, $p = 0.40$; males: sham 256 [238.5–279.5] g, TBI 269.5 [256.3–280.5] g, $p = 0.38$). The rats were housed two per cage on a 12-h light/dark cycle with automatically controlled temperature ($23 \pm 3^\circ\text{C}$) and hygrometry ($50 \pm 5\%$). Cages were enriched with one wooden stick and a sizzle nest. Rats had *ad libitum* food and water access. After one week of acclimatization, the animals were handled gently for 5 min/day for one week to habituate them to the laboratory conditions and the experimenter.

Surgery and TBI induction

Rats were anesthetized with 5% isoflurane and received a subcutaneous infiltration of buprenorphine (0.02 mg/kg, Buprecare) and glycopyrronium bromide (0.1 mg/kg, Robinul-V). Animals were intubated with an endotracheal tube coated externally with pramocaine (Thronothane[®], Biocodex, Gentilly, France) and given 1.8–2.2% isoflurane in 30% oxygen/70% air via artificial ventilation (Ispra MA1 55-7058, Harvard Apparatus[®], Edenbridge, UK; tidal volume = 6 ml/kg, breath rate = 60/min, positive end expiratory pressure = 5 cm H₂O) during surgery. Animals remained in the stereotaxic frame and received an additional subcutaneous injection of ropivacaine (3.75 mg/mL, Naropeine) and lidocaine (5 mg/mL) in the scalp prior to incision. A circular craniotomy (4 mm diameter) centered 3.8 mm caudal to Bregma and 3.00 mm lateral to the midline was performed over the right hemisphere. A luer-lock syringe tip was attached to the skull and over the cranial window with cyanoacrylate and dental acrylic cement. Tubing (100 cm in length and 2.5 mm inner diameter, model TU0425, SMC) filled with saline was connected on one side to the lateral fluid percussion injury device (LFP, Custom Design and Fabrication, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA), and on the other side to the luer-lock tip cemented to the cranial window. The pendulum induced a single 20-ms fluid percussion pulse of 5 atm measured at the water column output. The pressure of the shockwave was also measured above the dura mater using an MLT0699 Disposable Blood Pressure Transducer (AD Instruments, Oxford, UK). A few drops of doxapram hydrochloride (Dopram) were applied on the tongue and the anesthesia was stopped. The shockwave was induced upon recovery of the hindpaw withdrawal reflex. The animal was placed on mechanical ventilation to compensate for potential respiratory problems. The scalp was sutured and the rat received 2 mL of 0.9% normal saline in the flank subcutaneously. The same

procedure, including a scalp incision and cranial window, was used for the sham group, but without TBI induction. Body temperature was set at 37 °C with a temperature-controlled heating pad (LSI Letica, Barcelone, Spanish). Breathing and heart rate were monitored with a MouseOx system (STARR Life Sciences Corp., Oakmont, PA, USA) or a connected jacket (ETISENSE, Lyon, France, <https://www.etisense.com/>). During the first few days after TBI surgery, animals were kept with a red heating lamp placed over one half of the cage, and given moistened food to facilitate food intake. When necessary, euthanasia performed with 5% isoflurane anesthesia followed by lethal intraperitoneal injection of barbiturates (Euthasol 100 mg/kg).

Determination of welfare items

Animals were first observed remotely through transparent cages to determine their general condition, grimace score, breathing rate, and spontaneous behavior. The experimenter then opened the cage and scored each animal's reaction to handling.

General condition, physical appearance: major items scored included coat (presence of piloerection, unkempt fur), eyes (presence of porphyrin), forelimbs and nose (clean or stained). We should note that aged animals have a tendency for a rougher, less silky coat.

Grimace scale: pain and discomfort were indexed based on facial expressions with the Rat Grimace scale developed by Sotocinal *et al.*¹; rated expressions include orbital tightening, nose/cheek flattening, and ear and whisker changes.

Breathing rate: breathing rate was observed visually, with attention to potential breathing problems (open mouth, wheezing, vocalizations or jerking) and cyanosis (paleness or blue coloration of the limbs, tail, ears, or nose).

Spontaneous behavior: animals must be housed in pairs to enable observation of social behavior and note any isolation from the congener. Subsequently, the experimenter moved each cage to a bench and opened it while watching the animal's behavior.

Reaction to handling: prostration, isolation, absence of movement or escape from the experimenter were considered signs of poor welfare.

Locomotion/gait: locomotion and gait were scored while the animal was on a table, with specific attention to the signs of atonia, loss of balance, and/or weakness.

Interaction with environment, enrichment: evidence of interaction with enrichment items, such as nibbling of the wooden stick or nesting.

Injury or sequelae: the surgical scar and incisor growth were examined daily. Because malocclusion can reduce food intake and lead to weight loss, incisor filing was performed under isoflurane anesthesia with miniature saw (Dremel, France) three times a week until resumption of normal wear if malocclusion was noted.

Hydration: hydration was determined by pinching the upper back skin and measuring its relaxation time.²

Body condition: each animal was observed visually and palpated on its back and flanks to feel the prominence of its bones.³

Statistical analysis

Data were analyzed in Prism version 8.4.3 (Graphpad software LLC, San Diego, CA) or R software 4.0.3.⁴ Raw data were first analyzed for normality with the Shapiro-Wilk test. For two-group comparisons, normally and non-normally distributed values were analyzed with Student's unpaired t-tests and Mann-Whitney U tests, respectively. Including both male and female animals in the study warranted statistical analysis with a two-way ANOVA for sex and TBI. Before the two-way ANOVA was performed, data samples were tested for homoscedasticity with the Levene test and normality of residues. For non-normally distributed residues or heterogeneity, raw data were transformed with the Box-Cox power transformation.⁵ If the two-way ANOVA revealed an interaction between sex and TBI, a Mann-Whitney U post-hoc test adjusted by the Bonferroni method was applied to identify specific differences. If not, no post-hoc tests were performed. Differences were considered significant at $p < 0.05$ for ANOVAs and at $p < 0.025$ for repeated Mann-Whitney U tests (Bonferroni adjustment for two consecutive comparisons).

Inter-experimenter variability was studied by calculating intraclass correlation coefficient, expressed with 95% confidence intervals based on a mean-rating ($k = 3$) absolute-agreement/two-way mixed-effects model, and interpreted based on that of Koo et al.⁶

Supplementary references

1. Sotocinal, S.G., Sorge, R.E., Zaloum, A., Tuttle, A.H., Martin, L.J., Wieskopf, J.S., Mapplebeck, J.C., Wei, P., Zhan, S., Zhang, S., McDougall, J.J., King, O.D. and Mogil, J.S. (2011). The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain* 7, 55.
2. Burkholder, T., Foltz, C., Karlsson, E., Linton, C.G. and Smith, J.M. (2012). Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice. *Current Protocols in Mouse Biology* 2, 145-165.
3. Hickman, D.L. and Swan, M. (2010). Use of a body condition score technique to assess health status in a rat model of polycystic kidney disease. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 49, 155-159.
4. R Core Team (2020). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing.
5. Box, G.E.P. and Cox, D.R. (1964). An Analysis of Transformations. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 26, 211-252.
6. Koo, T.K. and Li, M.Y. (2016). A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. *Journal of Chiropractic Medicine* 15, 155-163

Supplementary Table 1. Return to basal levels of scoresheet criteria and minimum weight after severe traumatic brain injury (TBI).

Parameter	Female (F)			Male (M)			P	
	Sham (n = 10)	TBI (n = 8)	Sham (n = 9)	TBI (n = 7)	Sham (F vs M)	TBI (F vs M)	Female (Sham vs TBI)	Male (Sham vs TBI)
Welfare (return to 10, days)	2.0 [0.0–3.0]	16.5 [10.5–24.5]	2.0 [0.0–3.0]	6.0 [4.0–12.0]	0.997	0.0496	< 0.0001	0.0007
Silky coat (days)	1.5 [1.0–3.0]	10.5 [7.0–27.8]	1.0 [0.5–2.0]	4.0 [3.0–8.0]	0.369	0.0185	< 0.0001	0.0044
Grimace scale (days)	0.0 [0.0–1.0]	9.0 [6.0–19.0]	1.0 [0.0–1.0]	4.0 [2.0–10.0]	0.448	0.179	0.0001	0.0083
Respiration (days)	0.0 [0.0–1.0]	2.5 [2.0–3.0]	0.0 [0.0–1.0]	2.0 [1.0–5.0]	> 0.999	0.6115	0.0002	0.0122
Spontaneous behavior (days)	0.0 [0.0–0.25]	1.0 [0.0–2.0]	0.0 [0.0–0.0]	0.0 [0.0–0.0]	0.4737	0.0741	0.0656	0.4375
Response to handling (days)	0.0 [0.0–1.25]	3.5 [3.0–4.8]	0.0 [0.0–1.0]	2.0 [1.0–11.0]	0.6213	0.4359	0.0002	0.0023
Locomotion (days)	0.0 [0.0–0.0]	7.5 [6.0–13.8]	0.0 [0.0–0.5]	3.0 [3.0–8.0]	0.0582	0.0559	< 0.0001	0.0002
Interaction with environment (days)	0.0 [0.0–0.0]	1.0 [0.25–2.75]	0.0 [0.0–0.0]	0.0 [0.0–0.0]	0.4737	0.0250	0.0015	> 0.999
Hydration (days)	0.5 [0.0–1.3]	15.5 [9.0–23.3]	1.0 [0.5–1.0]	7.0 [4.0–8.0]	0.4487	0.0065	< 0.0001	0.0038
Body condition (days)	2.5 [0.0–3.3]	12.5 [9.0–23.5]	1.0 [0.–3.5]	6.0 [3.0–9.0]	0.9689	0.0109	< 0.0001	0.038
Weight minimum (%)	-3.2 [-5.2–1.3]	-16.3 [-22.8–-11.1]	-3.3 [-7.2–-1.9]	-14.2 [-22.6–-6.2]	0.7802	0.5358	0.0003	0.0052

Data are presented as medians with interquartile range. Mann-Whitney U tests with Bonferroni correction ($p < 0.025$).

III. Suivi longitudinal des performances comportementales des rats soumis à un traumatisme crânien sévère

III.1. Introduction

Le traumatisme crânien (TC) est une cause majeure de décès et d'invalidité dans le monde touchant près de 69 millions d'individus chaque année (Dewan et al., 2018). Chez l'homme, la gravité du TC est stratifiée en légère, modérée et sévère, basée sur l'état de conscience des patients mesuré par l'échelle de Glasgow. Ces différentes sévérités partagent des mécanismes lésionnels similaires avec l'apparition d'agressions cérébrales primaires dès la blessure traumatique initiale, puis secondaires et enfin tertiaires tels que la dégénérescence cellulaire ou la neuroinflammation qui se développent au cours des heures, des jours voire des mois, jusqu'à une installation durable des déficits (Kaur & Sharma, 2018; Prasetyo, 2020). Environ 8 % des TC enregistrés sont classés sévères avec des lésions impliquant le pronostic vital des patients (Dewan et al., 2018; Maegele et al., 2019). Les patients victimes d'un TC sévère sont également sujets à une activité cérébrale anormale caractérisée par l'apparition d'épilepsie ou de dépolarisations corticales envahissantes pouvant accentuer les mécanismes secondaires délétères des lésions (Hartings et al., 2011; Sharma et al., 2021). Suivant les zones cérébrales impactées, les lésions neurologiques peuvent aboutir à des séquelles chroniques et persistantes comme des déficits sensoriels, moteurs, cognitifs impliquant la mémoire et l'apprentissage, et psychologiques tels que le développement d'anxiété ou de dépression, plusieurs années après l'accident traumatique (Barman et al., 2016; Obenaus, 2016; Rabinowitz & Levin, 2014; Walker & Pickett, 2007). Le TC sévère doit donc être considéré comme une pathologie distincte du TC léger ou modéré, de par la nature et la gravité des complications, ainsi que du temps de récupération et de rééducation, nécessitant une lourde prise en charge des patients.

De par le caractère hétérogène des lésions impliquant non seulement le cerveau mais aussi les fonctions périphériques comme les systèmes respiratoire, cardio-vasculaire et immunitaire (agressions cérébrales secondaires d'origines systémique), des modèles *in vivo* ont été développés afin de comprendre et évaluer les processus moléculaires, biochimiques, cellulaires et comportementaux mis en jeu après un TC sévère (Masel & DeWitt, 2010; Xiong et al., 2013). L'un de ces modèles est induit par percussion latérale de fluide (LFP) et provoque des lésions cérébrales focales et diffuses, reproduisant au moins en partie les TC chez l'Homme survenant suite aux accidents de la route ou de chutes (Thompson et al., 2005). Des déficits ont été observés dans le modèle de TC d'intensité

modérée à sévère par LFP, notamment des séquelles neurologiques et motrices, retrouvées quatre semaines et jusqu'à un an après la lésion (Hayward et al., 2010; McIntosh et al., 1989; Ouyang et al., 2017; Pierce et al., 1998). L'utilisation du test de la piscine de Morris a permis de montrer des troubles de l'apprentissage et de la mémoire 15 jours après le TC pouvant durer jusqu'à un an (Fangyi et al., 2002). Un état d'anxiété post-traumatique, mesuré par le test du labyrinthe en croix surélevé, est retrouvé dans le cas de TC léger à modéré 24 h après le TC mais pas à quatre semaines (Shultz, Sandy R. et al., 2011). Cette absence d'anxiété a été mentionnée chez des animaux ayant eu un TC modéré-sévère (Kuo, J. R. et al., 2013). Néanmoins, Jones *et al.* (2008) ont observé ces troubles à un et trois mois après un TC sévère chez le rat. La principale difficulté liée à l'interprétation de ces résultats réside dans la définition du TC sévère. Dans de nombreuses études, la sévérité du TC est définie par la pression maximale de l'onde de choc générée lors du TC (Nnode-Ekane et al., 2019; Ondek et al., 2020; Pierce et al., 1998; Sick et al., 2017). Or, dans le cas du LFP, cette pression est en général mesurée au niveau de la colonne d'eau et diffère significativement d'un laboratoire à un autre pour une même gravité voulue (introduction, partie IV). De plus, elle ne reflète pas la pression réelle au niveau cérébral, notamment de la dure-mère. Il est donc difficile de définir la sévérité du TC sur l'unique base de la pression. Ma *et al.* (2019) proposent dans leur revue d'évaluer un TC comme sévère à partir d'une pression induite en sortie du dispositif supérieure à 2,5 atm, d'un arrêt respiratoire supérieur à 24,9 s, d'un temps de récupération du réflexe de redressement supérieur à 10 min et d'une mortalité de la cohorte supérieure à 33 %. Néanmoins, ces chiffres diffèrent également entre les laboratoires, notamment en fonction d'une utilisation d'une ventilation mécanique ou de l'administration de médicaments stimulant la ventilation, comme le Doxapram hydrochloride dans notre laboratoire. De plus, lors d'un TC de grande intensité, une déchirure de la dure-mère est fréquemment observée. Or, cette complication ne fait pas partie de la pathophysiologie du TC et devrait être un facteur d'exclusion de l'animal qui n'est en général pas rapporté. Il y a donc un besoin d'une meilleure définition du TC sévère *in vivo* pour ensuite mieux caractériser ses conséquences comportementales chez l'animal.

Au cours du chapitre IV de l'introduction, nous avons défini des critères plus objectifs de TC sévères basés sur le temps de reprise de conscience (réflexe du retrait de la patte, réflexe de redressement) ainsi que sur le score de Coma pour le rat (RCS). Couplée à l'utilisation systématique de ventilation mécanique et de Doxapram hydrochloride, l'utilisation de ces critères de sévérité nous ont permis d'induire des TC sévères avec une faible perte d'animaux et un court arrêt respiratoire. L'observation d'une déchirure de dure-mère a aussi été un point limite déclenchant la mise à mort de l'animal et son exclusion de l'étude. Cette approche nous a permis d'évaluer à notre tour les conséquences comportementales du TC dans un contexte spécifiquement restreint à un TC sévère.

Cette évaluation longitudinale a été réalisée jusqu'à 155 jours (5,5 mois) après le TC et inclut des mesures de motricité, de performances cognitives et d'anxiété.

III.2. Matériels et méthodes

III.2.1. Animaux

Quarante-deux rats Sprague Dawley (ENVIGO, Gannat, France) ont été divisés en quatre groupes : 10 femelles et 9 mâles pour les groupes sham, 11 femelles et 12 mâles pour les groupes TC sévère. Ils étaient âgés de 10 semaines lors de la chirurgie. Afin d'homogénéiser les groupes, les animaux ont été assignés sham ou TC suivant leurs performances lors de l'entraînement (dernier jour) au rotarod et au GaitLab ainsi qu'en fonction de leur poids initial. Les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le comité d'éthique régional (APAFIS#10019) et réalisés conformément à la directive européenne 2010/63/UE. Les expérimentations se sont déroulées dans l'animalerie commune du Centre de recherches en Neurosciences de Lyon (autorisations DDA69675-01). Les animaux ne présentaient pas de différence de poids entre les animaux contrôles (sham) et traumatisés d'un même sexe. Les animaux étaient placés par deux ou trois dans des cages réglementaires, dans des conditions de température ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), d'hygrométrie ($50 \pm 5\%$) et d'un cycle d'éclairage (12 h) contrôlées. Les cages étaient enrichies d'un bâton en peuplier, de lanières frisées et de papier absorbant. Les animaux avaient de l'eau et de la nourriture *ad libitum*. Après leur semaine d'acclimatation, ils ont été manipulés doucement 5 min par jour par l'expérimentateur pendant une semaine et placés 30 min dans les pièces avant chaque test comportemental pour s'habituer à l'environnement.

III.2.2. Chirurgie et induction du traumatisme crânien

Nous avons utilisé un modèle de TC sévère induit par LFP, comme décrit précédemment (Eakin, et al., 2015). En résumé, les animaux ont reçu au préalable une analgésie générale à la buprénorphine (SC, 0,02 mg/kg,) ainsi qu'une injection de bromure de glycopyrronium (SC, 0,1 mg/kg, Robinul-V, Centravet, Lapalisse, France) avant l'anesthésie par un mélange d'air et d'oxygène (70 %/30 %) avec 5 % d'isoflurane. Par la suite, l'isoflurane a été maintenu à 1,5-2 %. Ils ont ensuite été intubés et placés sous ventilation artificielle tout au long de la chirurgie, puis placés dans un cadre stéréotaxique. Une anesthésie locale (5 mg/mL, Xylovet®, Ceva) et de ropivacaine (3,75 mg/mL, AstraZeneca LP) a été administré au niveau du scalp. Une craniotomie de 4 mm de diamètre a été réalisée à -3,8 mm en antéro-postérieur et à 3 mm en latéral (hémisphère droit). Puis, l'embout Luer lock fixé au capteur de pression artérielle a été positionné sur le site de la craniotomie, maintenus par du ciment dentaire et

l'appareil LFP a été calibré. Les rats ont été reliés au LFP par une tubulure remplie de sérum physiologique et l'anesthésie a été stoppée. Ils ont reçu quelques gouttes de doxapram hydrochloride (Dopram-V, Centravet, Lapalisse, France) sur la langue et le museau avant le TC. Une onde de choc de 20-21 ms et de 5 atm mesurée par le capteur de pression du LFP (enregistrement avec le logiciel LabChart, version 8, ADInstrument, Oxford, Royaume-Uni) a été induite dès le retour du retrait de la patte ou d'une légère contraction musculaire en réponse au pincement du membre. Cette pression de 5 atm correspond à un TC sévère. Après l'induction du TC, les animaux ont été replacés sous ventilation artificielle sans isoflurane puis le pan cutané a été refermé par des points de sutures. Les animaux ont reçu des injections par voie sous-cutanée de sérum physiologique pour lutter contre la déshydratation. Les animaux des groupes sham ont eu une intervention chirurgicale identique mais n'ont pas reçu le TC.

Les animaux présentant une déchirure de la dure-mère ont été retirés du protocole et mis à mort par une injection en intrapéritonéale de pentobarbital sodique (100 mg/kg, IP, Euthasol, Centravet).

III.2.3. Suivi du réveil des animaux

Dès l'induction du TC ou l'arrêt de l'isoflurane pour les groupes sham, l'état de conscience des animaux est suivi jusqu'à leur réveil avec l'échelle de coma pour rat (RCS) de Pais-Roldan *et al.* (2019). Cette grille va de 0, correspondant à un état comateux, à 16 pour un réveil total (reprise de la conscience). Les paramètres observés sont le clignement de l'œil, la fonction motrice, les réflexes du tronc cérébral, la respiration, le réflexe de redressement, la réponse auditive et le mouvement des vibrisses. Afin de normaliser ce suivi et de limiter l'effet de l'anesthésie, le temps initial correspond au retour du retrait de la patte après l'arrêt de l'isoflurane, c'est-à-dire le moment de l'induction du traumatisme pour les groupes TC. Les animaux traumatisés ayant un temps de retour de la conscience égal ou inférieur à 25 % du score le plus élevé des groupes sham ont été retirés du protocole (RCS \geq 13). Nous avons considéré que ces animaux n'avaient pas de TC sévère. Cet échec d'induction du TC pourrait être dû à un site de la craniotomie légèrement déplacé, à la propagation de l'onde de choc dans la tubulure et de sa déformation ou aux différences propres de l'animal.

Les animaux reçoivent une injection de sérum glucosé en SC et sont ensuite replacés dans leur cage sous une source de chaleur proche de 37°C et avec une coupelle de croquettes humidifiées.

III.2.4. Suivi du bien-être animal

La grille de bien-être développée et décrite précédemment (résultats, partie II) a été utilisée pour quantifier l'état général des rats quotidiennement, pendant la durée de l'expérimentation

animale. Brièvement, la grille comporte des items décrivant l'état physiologique des rats notés quotidiennement sur un score total de 90 points. Elle comporte quatre niveaux de score : condition physiologique (0 - 10), présence d'inconfort ou de douleur possible (11 - 60), souffrance et douleur avérées (61 - 89) et état de mal-être généralisé sans retour possible (≥ 90). Le dépassement de ce dernier score ou d'un point limite aboutit à la mise à mort des animaux.

Les rats traumatisés présentant un score inférieur ou égal à 10 le 4^{ème} jour après-TC ont été retirés de l'étude. De plus, le TC n'était pas considéré comme sévère.

III.2.5. Score de sévérité neurologique

Le score neurologique a été réalisé suivant 12 items basés sur la version modifiée des méthodes décrites par Beni-Adani *et al.* (2001) et Hausser *et al.* (2018). Un score maximal de 24 indiquant des déficits moteurs, de l'équilibre et de la vigilance chez le rat qui sont la marche spontanée, le comportement rotatoire, la réaction à la poussée latérale en ipsi- et controlatéral, la flexion du corps et des membres lors de la suspension par la queue, le déclenchement visuel et le sursaut suite à un bruit. Chaque paramètre était noté 0 (sans déficit), 1 (déficit mineur) ou 2 (déficit majeur). Cette tâche a été réalisée un jour avant la chirurgie pour vérifier le bon état neurologique des animaux (score de zéro), et à J2, J7, J15, J28 et J160 après le TC.

III.2.6. Evaluation de la motricité

III.2.6.a. Test du Rotarod

Un dispositif de rotarod (**Figure 48**) a été utilisé pour évaluer les déficits moteurs. Tous les animaux ont été entraînés sur 5 jours consécutifs avant la chirurgie où le premier essai consistait à familiariser le rat en le laissant 30 s sur la tige sans rotation. Puis les rats ont été évalués à J2, J7, J15 et J30 après le TC. Le rotarod a été réglé pour démarrer à zéro puis la vitesse rotative augmentait progressivement jusqu'à 35 tr/min en 300 s. Chaque rat a réalisé la tâche trois fois par jour, espacée d'au moins 45 min pour la récupération physique de l'animal. L'essai a pris fin lorsque l'animal tombait de la tige, se retenait à la tige en effectuant trois rotations, se retournait ou restait sur la tige pendant les 300 secondes. Les animaux n'ayant pas performé au-delà de 45 s lors du jour 5 de l'entraînement ont été exclus pour ce test. Toutefois, ils ont été gardés et ont reçu le TC ou la chirurgie, afin de les assigner pour les autres tests comportementaux pour lesquels ils ne montraient pas de différences dans leur performance avec leur congénère. Les données ont été moyennées par jour, puis représentées sous forme de pourcentage entre les performances quotidiennes et celles du 5^{ème} jour d'entraînement. Le dispositif était nettoyé entre chaque passage avec de l'éthanol à 10 %, puis de l'eau et essuyé, afin d'éliminer les odeurs des précédents rats pouvant les distraire.

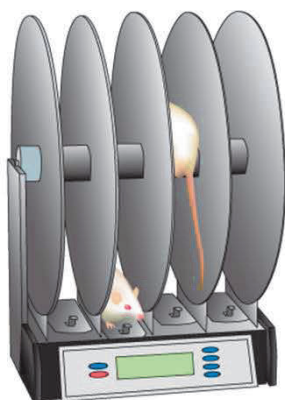


Figure 48. Représentation du dispositif rotarod. Le rat est positionné sur une tige tournante dont deux séparateurs forment un couloir. La rotation démarre à zéro et augmente jusqu'à 35 tr/min en 300 s. D'après <https://togotv.dbcls.jp/en/togopic.2014.43.html>.

III.2.6.b. Protocole du GaitLab

La marche a été analysée à l'aide du système automatisé GaitLab (ViewPoint, France). L'appareil est constitué d'un couloir délimité par des parois (8 cm de haut) et d'un espacement restreint, avec une plaque en verre de 1,25 m de long dont une faible lumière verte était diffusée par le côté dans la passerelle en verre. Quand la patte du rat touche la surface, la zone de contact brille et est détectée par une caméra positionnée en-dessous de la piste pour suivre la progression de l'animal. Les essais ont été réalisés dans un environnement sombre (éclairage inférieur à 1 Lux). Les rats étaient positionnés sur un tissu humide et devaient traverser le couloir pour rejoindre leur cage d'hébergement. Lors de l'entraînement pendant les 4 jours avant la chirurgie, les rats ont été doucement guidés pour réaliser au minimum 6 passages complets sur la passerelle (direction unilatérale) jusqu'à ce qu'ils effectuent la traversée volontairement avec une allure constante. Ensuite, les animaux ont réalisé ce test la veille puis à J2, J7 et J155 après le TC. Les passages où l'animal s'est arrêté, a sauté, n'a pas réalisé une traversée complète ou a adopté une marche rapide de type « galop » ont été exclus. Lors de l'essai seul les passages similaires ont été gardés, c'est-à-dire ayant une vitesse constante et semblable sur les 6 passages sans arrêt de l'animal avant d'arriver dans leur cage au bout de la passerelle. Les paramètres étudiés étaient la vitesse, la base d'appui des membres antérieurs et postérieurs, ainsi que le temps de contact ou non, la fréquence et la longueur de la foulée pour chaque membre (AG : antérieur gauche, AD : antérieur droit, PG : postérieur gauche et PD : postérieur droit, **Figure 49**). Le dispositif était nettoyé avec de l'éthanol à 10 % entre les animaux de cage différente afin d'éliminer les odeurs pouvant distraire les rats lors de leur traversée.

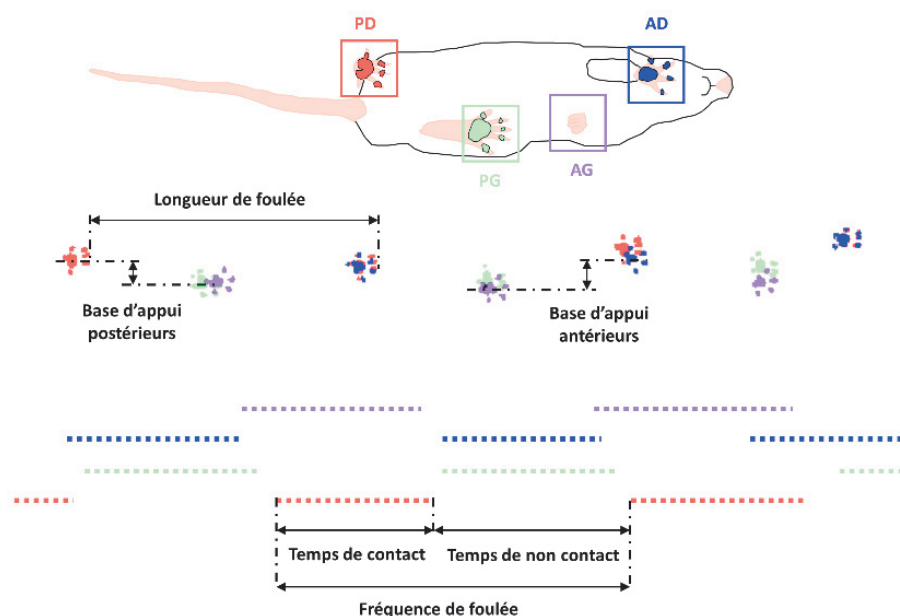


Figure 49. Paramètres étudiés lors du protocole du GaitLab. Le rat traverse une passerelle en verre éclairée par une faible lumière afin d'observer les pattes de l'animal lors de sa marche. AG : antérieur gauche, AD : antérieur droit, PG : postérieur gauche et PD : postérieur droit. D'après <http://www.viewpoint.fr/en/home>.

III.2.7. La piscine de Morris

III.2.7.a. Apprentissage spatial

Le labyrinthe de Morris (*Morris Water Maze*) est un test aquatique pour évaluer les performances d'apprentissage spatial. Une cuve circulaire (180 cm de diamètre et 60 cm de haut) a été remplie avec de l'eau maintenue à 24°C d'une profondeur de 34 cm. L'ajout de gouache noire permettait de rendre l'eau opaque pour dissimuler visuellement la plateforme (15 cm de diamètre, immergée sous 2,5 cm de la surface de l'eau et placée à 45 cm du bord) des rats. Les indices visuels (un par mur) autour de la pièce ont été gardés à la même position d'un jour à l'autre. La piscine a été divisée en quatre quadrants virtuels de superficie identique définis comme Nord (N), Est (E), Sud (S) et Ouest (W). Le positionnement de la plateforme au nord à 36,5 cm du bord était constant tout au long de l'expérience. Les rats ont été testés sur 12 essais au total, réalisés pendant quatre jours consécutifs à partir de J115 post-TC (3,7 mois). Chaque jour, les rats ont été soumis à 3 passages à 3 h d'intervalle et la session durait 90 s. Le rat était placé pour le premier test (apprentissage) directement sur la plateforme pendant 60 s avant d'être séché à l'aide d'une serviette puis placé dans sa cage sous une lampe chauffante. Puis pour les essais suivants, il a été introduit dans l'eau, la tête face à la paroi de la piscine. Sa position de départ changeait à chaque essai comme décrit dans le **tableau XII**. Les animaux

ne trouvant pas la plateforme ont été guidés jusqu'à elle et sont restés 20 s dessus. Un rat était qualifié de « trouveur de plateforme » lorsqu'il trouvait la plateforme lors de trois essais consécutifs. Les rats ont été suivis par vidéo à l'aide d'une caméra, placée au plafond juste au-dessus du centre de la cuve, reliée au logiciel EthoVision XT 15.0 (Noldus, France) qui calculait la distance, la vitesse, et le temps pour trouver la plateforme. Aucun expérimentateur n'était présent dans la pièce pendant les essais.

Tableau XII. Protocole du labyrinthe aquatique (*Morris Water Maze*) à J115 après le traumatisme crânien. S : sud, N : nord, W : ouest, E : est.

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4
Essai 1	Plateforme (60s)	W	S	E
Essai 2	S	E	W	W
Essai 3	W	S	E	S

III.2.7.b. Rétention de la mémoire

Les animaux ont été introduits pendant 90 s dans la piscine le 5^{ème} jour (J119 post-TC) afin d'observer la mémoire spatiale. Pour cela, les paramètres étaient identiques mais la plateforme avait été retirée. Le temps passé dans le quadrant nord a été mesuré comme référence de mémorisation.

III.2.8. Evaluation de l'anxiété et de la mobilité

III.2.8.a. Test du zero-maze

Le dispositif du zero-maze est composé d'une piste en forme d'anneau en acrylique (100 cm de diamètre externe et 11 cm de largeur de la piste) surélevée de 60 cm et divisée en quatre aires, deux avec des parois noires (zone fermée, ZF, 37 cm de haut) et deux sans parois (zone ouverte, ZO) considérées comme des zones anxiogènes (**Figure. 50.A**). Une caméra reliée au logiciel d'analyse EthoVision XT 15.0 a été placée au plafond au centre du labyrinthe, afin de mesurer la distance, le temps et la vitesse dans l'aire totale mais aussi dans les ZF et ZO au cours des 5 min de passage du rat. Le placement du museau et du corps de l'animal définissait la zone où il se trouvait. Après chaque passage, le dispositif (piste et parois) était nettoyé avec de l'alcool à 10 % puis essuyé. L'utilisation de lampes infrarouges permet d'enregistrer l'activité de l'animal dans les ZF. La luminosité était de 35 Lux

dans les ZO et de 2 Lux dans les ZF. L'anxiété a été mesurée le matin (9h00 à 11h00) au jour 8 et 110 post-TC et les animaux ont débuté l'essai au milieu de la ZO.

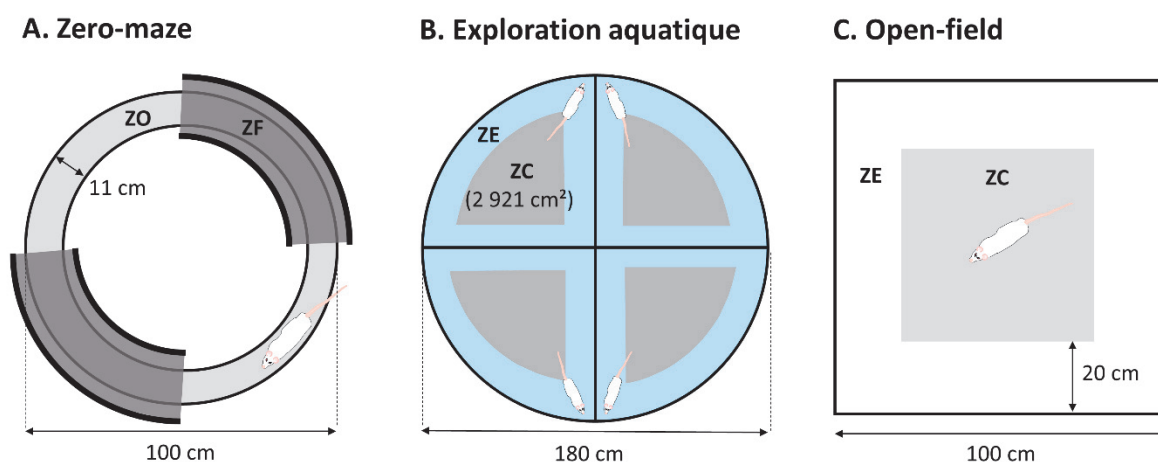


Figure 50. Dispositifs pour mesurer l'anxiété des rats après un traumatisme crânien. Trois systèmes différents ont été utilisés pour mesurer l'état d'anxiété des animaux en délimitant virtuellement des zones anxiogènes. Le zero-maze (A) est divisé en zones ouvertes (ZO, anxiogène) et fermées (ZF) tandis que les cuves du labyrinthe aquatique (B) et l'open-field (C) ont été subdivisées en zone externe (ZE) et en zone centrale (ZC, anxiogène). La cuve du test aquatique a été divisée en quatre quadrants identiques permettant le passage de quatre rats simultanément.

III.2.8.b. Test de l'exploration aquatique

La cuve de Morris a été divisée en quatre quadrants identiques (6 358 cm² chacun) par deux séparateurs opaques de 180 cm de long. Le logiciel EthoVision XT 15.0 a calculé le temps, la distance et la vitesse d'exploration dans le quadrant complet ainsi que dans la zone externe (ZE) et dans la zone centrale (ZC, 2 921 cm²) considérée comme anxiogène et délimitée virtuellement par le logiciel (Figure 50.B). Quatre rats sont testés simultanément, mais séparément, pendant 5 min. Le point central du corps définissait le placement de l'animal. Au début du test, les rats sont placés dans un coin la tête face à la paroi. Ce test a été réalisé l'après-midi (14h00 à 16h00) aux 8 et 110 jours après le TC.

III.2.8.c. Open-field

Le test de l'open-field informe sur l'état d'anxiété de l'animal et sur son activité/mobilité. Le dispositif est constitué d'un champ carré de 100 cm de côté avec des parois de 60 cm de haut. Le dispositif a été délimité virtuellement en zone externe (ZE, bord du champ) de 20 cm de large et en zone centrale (ZC) proposée comme une aire anxiogène (Figure 50.C). Comme pour le zero-maze, des

lampes infrarouges ont été utilisées et la luminosité était de 25-30 Lux dans les coins et la périphérie, et de 30-35 Lux au centre du dispositif. Une caméra placée au plafond au centre de l'open-field et reliée au logiciel EthoVision XT 15.0 a enregistré les essais et calculé la distance, le temps et la vitesse de marche dans chaque zone. Les animaux ont été placés dans la ZC et ont été laissés libres de se mouvoir pendant 5 min au jour 145 après le TC. Le dispositif était nettoyé après chaque passage des animaux avec de l'éthanol à 10 % puis séché.

III.2.9. Imagerie par résonance magnétique

Un suivi en imagerie par résonance magnétique (IRM) a été réalisé sur un imageur 7T adapté au rongeur (Bruker Biospin, Ettlingen, Allemagne) avant puis à 6h, J2, J7, J15, J30 et J60 après l'induction du TC afin de caractériser les lésions cérébrales. Après l'induction de l'anesthésie par un mélange d'air et d'isoflurane à 4 %, les animaux ont été installés dans le berceau de l'IRM et maintenus par des barres de gueule et d'oreille et placés sous 1,8 % d'isoflurane. Leur température était maintenue à 37°C par un système de chauffage localisé dans le berceau. La fréquence respiratoire était suivie grâce à un ballonnet à pression positionné sous l'abdomen du rat et relié à un système récepteur (ECG Trigger Unit HR V2.0, RAPID Biomedical, Rimpar, Allemagne). Ce dispositif permet d'adapter l'anesthésie pendant l'acquisition des images, notamment au temps précoce où l'animal peut présenter une déficience respiratoire suite au TC.

Une première séquence FLASH (*Fast Slow Angle Shot*) a été effectuée (TR/TE = 100/4 msec ; résolution = 0,39 x 0,39 x 3 mm³ ; temps d'acquisition de 12 s) donnant trois images correspondantes chacune à un plan (axial, coronal et sagittal) afin de vérifier le positionnement de l'animal suivant les trois directions. L'imagerie anatomique a été acquise par une imagerie pondérée en T2 avec une acquisition rapide en séquence d'échos recentrés donnant 23 coupes sur le plan coronal entre les bulbes olfactifs jusqu'au milieu du cervelet (facteur RARE de 8 : TR/TE = 4500 /15 msec ; nombre d'expériences = 1 ; FOV = 30 x 30 mm² ; résolution = 0,156 x 0,156 x 1 mm³ ; temps d'acquisition = 5 min). Ce type d'imagerie permet d'observer en hyposignal la présence de sang dans le parenchyme (hématome) et en hypersignal le liquide céphalorachidien ou l'œdème vasogénique.

III.2.10. Immunohistochimie

III.2.10.a. Prélèvement du cerveau

A la fin du protocole les animaux ont été anesthésiés par de l'isoflurane à 5 % dans un mélange d'air/O₂ (70 %/30 %) après avoir reçu au préalable une injection de buprénorphine par voie sous-cutanée (0,02 mg/kg). Puis une injection de pentobarbital sodique (100 mg/kg, IP, Euthasol, Centravet) leur a été administrée. Dès l'arrêt respiratoire, les animaux ont été perfusés par voie intracardiaque

(débit de 30 mL/min avec 300 mL) avec une solution de tampon salin (PBS, 0,1 M, pH 7,4, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) mélangée à 0,1 % d'héparine à 4°C, puis de 300 mL d'une solution de paraformaldéhyde à 4 % (PFA mélangé avec du PBS 0,1M à 4°C) afin de fixer les tissus. Le cerveau a été prélevé et placé dans une solution de PFA 4% pendant deux jours, puis dans une solution de saccharose à 30 % les deux jours suivants. Enfin le cerveau a été congelé en le plongeant dans une solution d'isopentane à -50°C et stocké à -80°C.

III.2.10.b. Marquages des neurones

Les cerveaux ont été coupés dans le plan coronal d'une épaisseur de 20 µm avec un cryostat (Micron NX50) à -20°C. Les tranches ont été récupérées dans des plaques de 24 puits (1 coupe par puit) remplies soit d'une solution de conservation à -20° (cryoprotectant : 20 % de glycérol, 30 % de glycol éthylène et 50 % de PBS 1X), soit directement dans une solution de PBS 1X pour réaliser les immunomarquages.

Les coupes ont été rincées quatre fois dans du PBS 1X (0,5 mL) pendant 10 min sous une légère agitation mécanique afin d'éviter que les coupes collent aux parois des puits, à température ambiante. Ensuite, elles ont été incubées avec une solution de perméabilisation (PBS/T/D : PBS 1X mélangée à 0,3 % de triton X100 et 3% de sérum de chèvre, 400 µL/puit) pendant 2 h sous agitation mécanique. Les coupes ont été incubées pendant 24 h à 4°C avec l'anticorps primaire NeuN (souris, 1/1000, # MAB-377, lot #3439830, Millipore Merck) dans la même solution que précédemment. Le lendemain, trois rinçages ont été réalisés avec du PBS 1X pendant 10 min, puis, les coupes ont été incubées avec l'anticorps secondaire IgG de souris Alexa Fluor 647 (chèvre, 1/1000, # A11001, lot # 2247988, Invitrogen) dans une solution de PBS/T/D à l'abri de la lumière pendant 2 h à température ambiante. Enfin, trois rinçages au PBS 1X ont été réalisés avant le montage entre lame et lamelle avec du milieu de montage contenant du DAPI (Fluoroshield, Sigma) et scellées avec du vernis à ongle (solution de montage organique).

III.2.10.c. Scanner de lame

Les lames ont été observées au scanner de lame Axio Scan.Z1 au Centre d'Imagerie Quantitative Lyon EST (CIQLE, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France) avec un objectif x20 (NA : 0,45, N. Achromat) et visualisées avec le logiciel ZEN. Les images ont été acquises en deux étapes : le DAPI est révélé par une longueur d'onde d'excitation à 353 nm et une émission à 465 nm, et le NeuN par une excitation à 495 nm et une émission à 519 nm. Les images ont été analysées avec le logiciel FIJI (<https://imagej.net/Fiji>).

III.2.11. Analyses statistiques

Les données ont été représentées sous forme de médiane \pm [interquartiles] et les analyses ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism version 8.4.3 (Graphpad software LLC, San Diego, CA) ou RStudio 4.0.3 (R Core Team, 2020). Dans un premier temps, la normalité des données et des résidus a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk. La comparaison de deux groupes a été analysée par le test de Student pour des distributions normales, ou par le test non paramétrique de Mann-Whitney pour des distributions déviant significativement de la normalité. L'inclusion des rats mâles et femelles dans l'étude du score de bien-être a nécessité une transformation Box-Cox (Box & Cox, 1964) des données car les variances étaient hétérogènes (test de Levene), puis une ANOVA à deux facteurs pour le sexe et le TC a été appliquée. Dans l'étude, le temps (mesures répétées) a également été un facteur pris en compte en plus de ceux du sexe et du groupe. La correction de la méthode de Geisser et Greenhouse a été appliquée dans le cas d'une violation de l'hypothèse de sphéricité. Une ANOVA à 3 facteurs sur des mesures répétées a été utilisée. Dans le cas d'un effet groupe et temps sans le facteur sexe, nous sommes tournés vers une ANOVA à 2 facteurs sur des mesures répétées. Pour les résultats du GaitLab, des animaux n'ont pas réalisés le protocole à J2 et donc un modèle à effet mixte (REML) a été réalisé. Par la suite, une analyse multiple par la méthode de Bonferroni a testé les différences entre les groupes deux à deux par des comparaisons consécutives. Les différences ont été déterminées comme significative si la p-value était inférieure à 0,05 (seuil de significativité fixé à 5 %).

III.3. Résultats

III.3.1. Inclusion des rats

Une femelle et quatre mâles ont eu une déchirure de la dure-mère après le TC et ont donc été retirés de l'étude. De plus, une femelle (sur un total de 10) est décédée 30 min après le TC suite à une défaillance respiratoire. Un délai de reprise de conscience mesuré par le RCS supérieur à 40 min était la limite pour définir un TC sévère et intégrer les animaux dans l'étude. Une femelle et trois mâles ont eu un temps, respectivement de 10, 25, 40 et 40 min et ont donc été exclus (**Figure 51.A**). Le score de bien-être quatre jours post-TC chez ces mâles était de 0, 0 et 5, donc inférieur à 10 et semblable aux groupes sham. La femelle traumatisée avait un score de 77 similaire à ces congénères TC (**Figure 51.B**). Nous avons décidé de l'exclure de l'étude car elle présentait au moins un des critères de TC non sévère. Dans l'ensemble, notre étude a inclus 19 animaux sham (10 femelles et 9 mâles) et 13 rats avec TC sévère (8 femelles et 5 mâles). Le TC induit chez les animaux exclus était considéré comme léger-moderé.

III.3.2. Sévérité du traumatisme crânien

Le TC a été induit avec une onde de choc de 5 atm (4,99 [4,95 – 5,02] atm pour les femelles *versus* 5,0 [4,97 – 5,03] atm pour les mâles, test de Student, $p = 0,14$) en sortie du réservoir du LFP. Le pic atteint au niveau de la dure-mère mesuré par le capteur de PA était diminué de 55,33 [52,42 – 59,21] % chez les femelles et de 49,47 [48,12 – 52,73] % chez les mâles. Le groupe TC femelle ($n = 8$) a donc reçu une onde de choc significativement plus forte que les mâles ($n = 5$) avec 2,76 [2,60 – 2,97] atm pour les femelles et 2,50 [2,40 – 2,63] atm pour les mâles (test de Student, $p = 0,03$). Deux animaux exclus de l'étude (une femelle et un mâle) ont reçu, respectivement, une pression de 2,77 atm et de 2,82 atm, mais n'ont pas montré de symptômes indiquant un TC sévère (**Figure 51.C**). La reprise de conscience était significativement plus longue pour les femelles (sham : 10,0 [0,0 – 21,25] min *versus* TC : 100,0 [82,50 – 145,0] min, Mann-Whitney, $p < 0,001$) que pour les mâles traumatisés (sham : 5,0 [5,0 – 7,5] min *versus* TC : 100,0 [80,0 – 110,0] min, $p < 0,001$). La récupération du réflexe du retrait de la patte n'était pas différente suivant le sexe pour les rats traumatisés (femelle : 57,0 [26,25 – 73,50] min *versus* mâle : 36,0 [22,0 – 51,50] min, test de Student, $p = 0,26$, **Figure 51.D**). Les groupes TC présentaient un temps du retour du réflexe de redressement supérieur au groupe sham tant pour les femelles (sham : 7,5 [0,0 – 20,0] min *versus* TC : 85,5 [74,75 – 109,8] min, test de Mann-Whitney, $p < 0,001$) que pour les mâles (sham : 0,0 [0,0 – 4,0] min *versus* TC : 84,0 [59,0 – 88,0] min, Mann-Whitney, $p < 0,001$, **Figure 51.E**). Les quatre rats exclus de cette étude présentaient des temps de récupération de ces réflexes similaires aux groupes sham. La respiration spontanée chez les rats traumatisés revenait en 30 s mais ils présentaient une cyanose au niveau des membres, de la muqueuse buccale et des oreilles au cours des 5 min après le TC. Un hématome sous-dural au site de l'impact a été observé chez 50 % des femelles (4/8) et chez tous les mâles. L'ANOVA à 2 voies a montré que le score du bien-être animal à quatre jours était plus élevé dans les groupes TC (59,0 [39,0 – 80,0] pour les femelles et 34,0 [28,0 – 79,50] pour les mâles) que les animaux sham (0,0 [0,0 – 2,75] pour les femelles et 5,0 [0,0 – 6,0] pour les mâles, $F(1, 28) = 143,2$, $p < 0,001$) sans différence entre les sexes ($F(1, 28) = 0,029$, $p = 0,87$). Les animaux sham ont récupéré un état de bien-être en 2,0 [0,0 – 3,25] jours pour les femelles et de 2,0 [0,5 – 3,0] jours pour les mâles contre un temps tardif pour les groupes TC de 16,50 [10,75 – 28,0] jours pour les femelles (Mann-Whitney, $p < 0,001$) et de 9,0 [5,50 – 23,50] jours pour les mâles ($p < 0,001$).

Ainsi, le TC sévère a été démontré par quatre critères : (1) la pression appliquée au site de la craniotomie, (2) le temps du retour de la conscience (RCS ≥ 13), (3) la reprise des réflexes de retrait de la patte et de redressement (critères inclus dans le RCS), et (4) le score de bien-être animal quatre jours après TC.

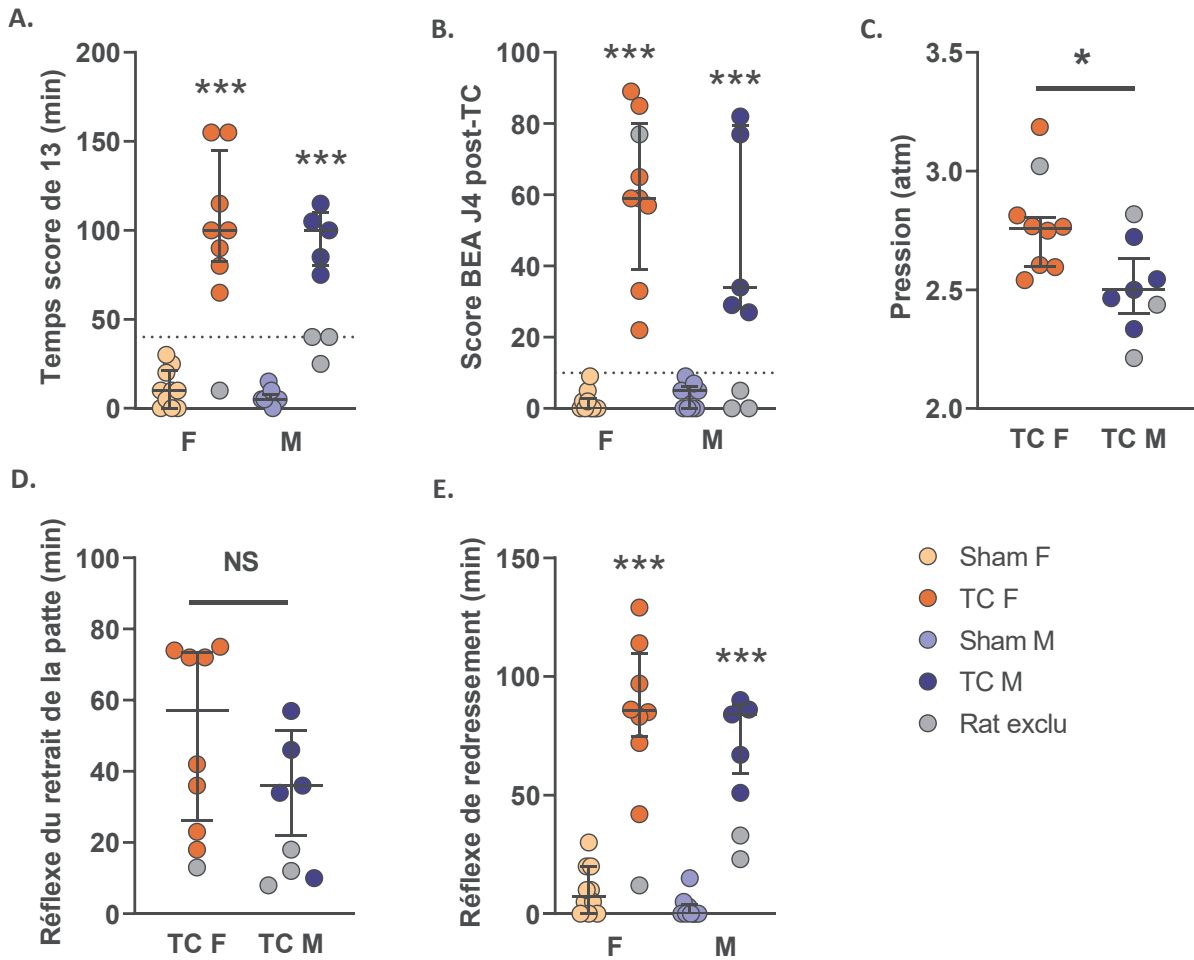


Figure 51. Inclusion des rats et sévérité du traumatisme crânien. Les paramètres d'inclusion des animaux traumatisés femelles (n = 8) et mâles (n = 5) sont le temps du retour de la conscience mesurée (score de 13) avec l'échelle de coma pour rat (A) et le score de bien-être animal (BEA) à 4 jours post-TC (B). La ligne en pointillée correspond au seuil d'exclusion des animaux traumatisés (40 min pour le retour de la conscience et score de 10 pour le BEA). C. La pression de l'onde de choc traumatique contre la dure-mère. Les réflexes du retrait de la patte (D) et du redressement (E) sont deux items de l'échelle de coma utilisés pour mesurer la sévérité. Les valeurs sont représentées en tant que médiane \pm [IQ]. Les rats exclus de l'étude n'ont pas été inclus des tests statistiques. Sham F : n = 10 et sham M : n = 9, NS : non significatif, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

III.3.3. Observations qualitatives histologiques et comportementales

Un suivi longitudinal par IRM après le TC a montré la présence d'un hématome intraparenchymateux le long du corps calleux en ipsilatéral dès 6 h et qui perdurait jusqu'à 60 jours. Des lésions de la substance blanche étaient visibles également dans le corps calleux au site de l'induction

du TC au cours de cette même période. Un hypersignal intraventriculaire était observable au deuxième jour suggérant d'une dilatation ventriculaire. De plus, l'hippocampe ipsilatéral présentait une déformation à partir du 7^{ème} jour après le TC (**Figure 52**). Des analyses complémentaires seront menées prochainement pour étendre les zones d'analyse au-delà de la zone d'induction du TC, et sur un nombre plus élevé de cerveaux pour permettre une analyse quantitative.

Le marquage immunohistochimique des neurones par NeuN au niveau de la coupe coronale a été effectué 160 jours après le TC, et a suggéré une baisse de la densité neuronale dans le cortex temporal du côté ipsilatéral au TC (cortex somatosensoriel primaire-secondaire). Cependant, cette zone présentait un fort marquage nucléaire au DAPI et donc des noyaux. Ces résultats évoquent une dégénérescence des neurones ainsi qu'une prolifération d'une autre population cellulaire probablement gliale. Nous n'avons retrouvé ce phénomène dans aucune autre aire cérébrale à ce jour. Il est également important de souligner d'une déformation de l'hippocampe en ipsilatéral, comme retrouvée dans les imageries d'IRM, une hyperdilatation ventriculaire formant une cavité ainsi qu'une atrophie du cortex temporal du côté du TC (**Figure 53**). Des analyses quantifiables des changements de signaux en T2 seront effectuées et ceci sur un plus grand nombre d'animaux. De plus, des analyses des séquences de T1 avec une injection de gadolinium (agent de contraste), des cartes de perfusion cérébrales et de tenseur de diffusion à ces différents temps seront réalisées. Cette étude pourrait aboutir à une mise en corrélation avec les changements comportementaux des animaux traumatisés au cours du temps.

Un autre symptôme intéressant chez les animaux traumatisés fut l'apparition de crises tonico-clonique épileptiques survenues chez une femelle et un mâle (2/13 animaux) à partir d'un mois après la lésion initiale (TC) et jusqu'à 160 jours. Ces épisodes duraient environ deux minutes et survenaient lors de la préhension des animaux pour l'évaluation des scores de bien-être, du NSS ou des sessions pour le GaitLab.

Suite à un TC sévère, des anomalies cérébrales se sont ainsi développées au cours du temps avec notamment un hématome cérébral, une lésion de la substance blanche au niveau du corps calleux, une dilatation ventriculaire ainsi qu'une densité neuronale diminuée dans le cortex somatosensoriel. De plus, certains animaux semblaient avoir développé des crises d'épilepsie post-traumatique.

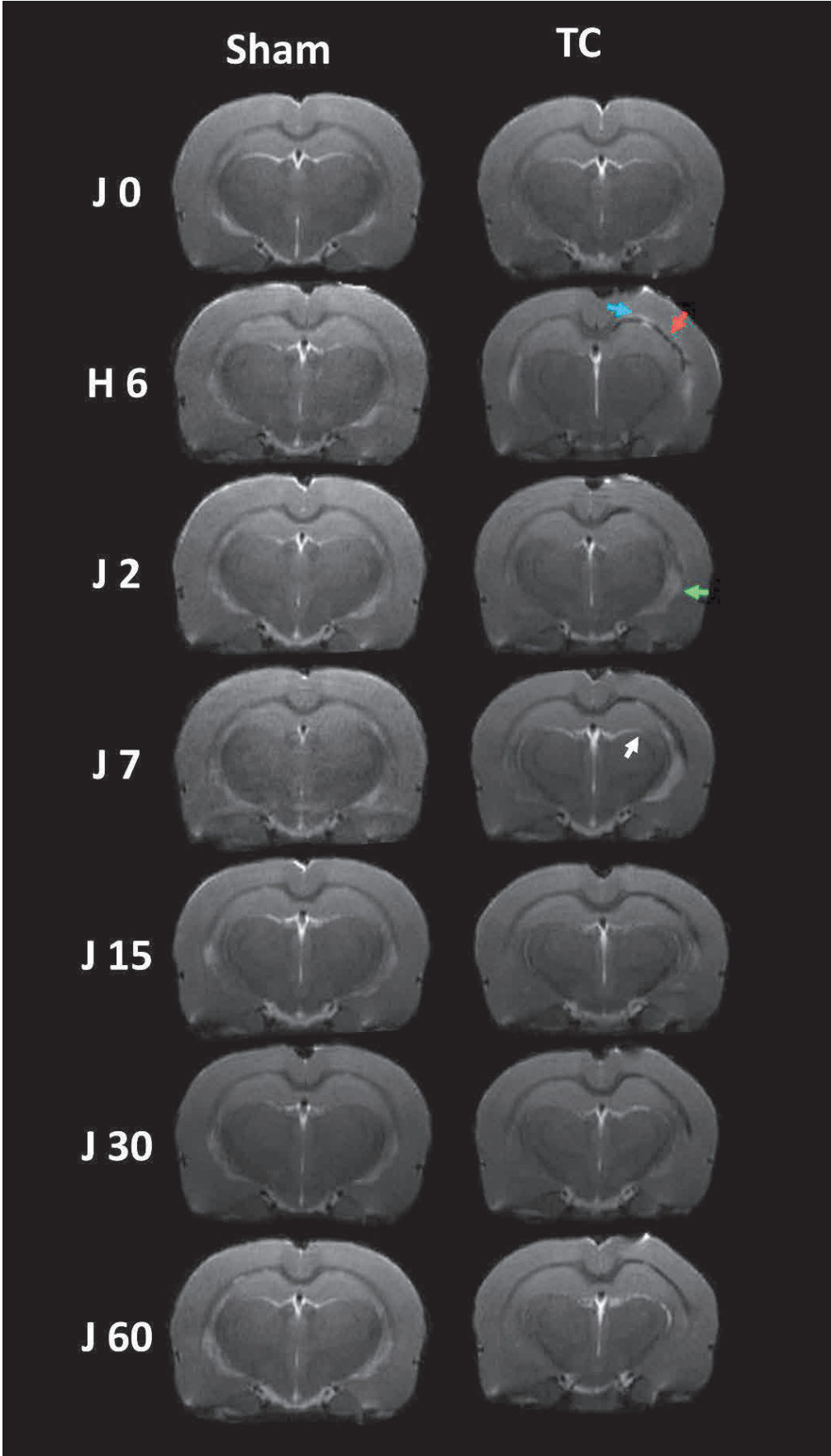


Figure 52. Illustration des images acquises par IRM pondérées en T2 sur 60 jours après un traumatisme crânien sévère chez le rat. Les coupes coronales en -3,0 à -3,50 mm dans l'axe antéro-postérieur après un traumatisme crânien (TC) montrent un hématome intraparenchymateux au niveau du corps calleux (flèche rouge) présent jusqu'à 60 jours, des lésions de la substance blanche sous-corticale au site de la lésion (corps calleux, flèche bleue) et un hypersignal au niveau ventriculaire suggérant une dilatation de celui-ci (flèche verte). La ligne médiane est légèrement décalée avec une déformation de l'hippocampe ipsilatéral dès le jour 7 après le TC (flèche blanche).

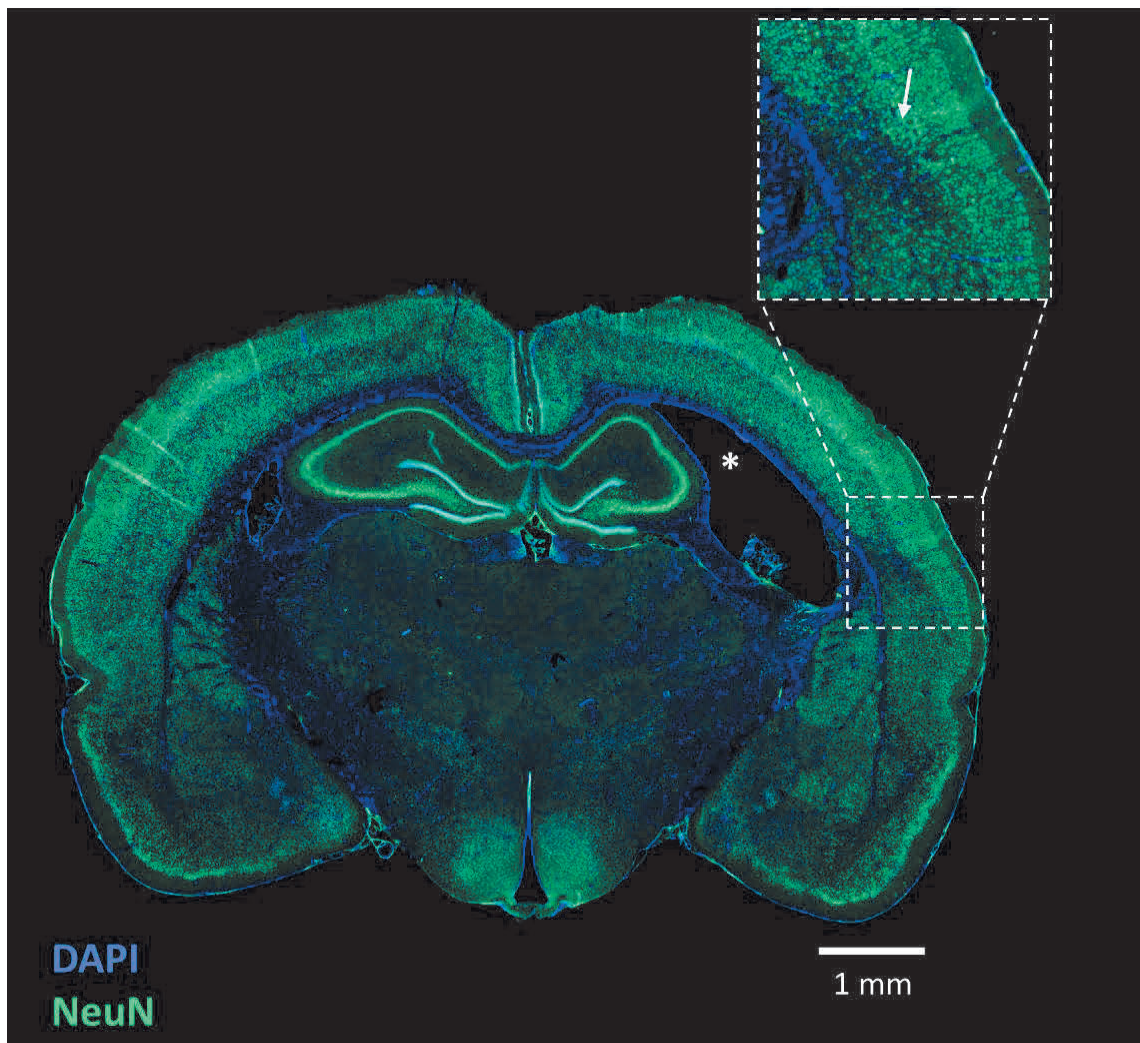


Figure 53. Marquages des neurones 160 jours après l'induction d'un traumatisme crânien sévère chez le rat. Représentation d'une coupe de cerveau d'un rat traumatisé, dans le plan coronal en -3,0 à -3,20 mm dans l'axe antéro-postérieur. À 160 jours, une dilatation ventriculaire et une déformation de l'hippocampe étaient présents du côté ipsilatéral (astérisque blanc), ainsi qu'une atrophie du cortex temporal du côté controlatéral. Le marquage des neurones (NeuN) dans le cortex temporal ipsilatéral est absent (flèche blanche) malgré une présence de noyaux (marquage au DAPI).

III.3.4. Évaluation des déficits sur le long terme

III.3.4.a. Score neurologique

Le score neurologique a été observé avant la chirurgie (jour 0) jusqu'à 160 jours. L'analyse de la récupération neurologique au cours du temps par une ANOVA à 3 facteurs sur mesures répétées a révélé un effet principal du TC ($F(5, 28) = 98,54, p < 0,001$) et du temps après le TC ($F(5, 140) = 97,91, p < 0,001$), ainsi qu'une interaction entre ces deux paramètres ($F(5, 140) = 54,73, p < 0,001$). Les animaux ont récupéré un score neurologique non significativement différent des rats sham après plus de 28 jours pour les femelles et seulement 15 jours pour les mâles. Aucune différence significative entre mâles et femelles n'a cependant été mise en évidence par une analyse multiple de Bonferroni. En prenant pour référence le score neurologique précédant le TC, le score des femelles était significativement augmenté pendant 160 jours et celui des mâles, pendant 15 jours (**Figure. 54**). Les détails des analyses statistiques sont présentés dans le **tableau XIII**.

Ces données indiquent une altération neurologique persistante après un TC sévère.

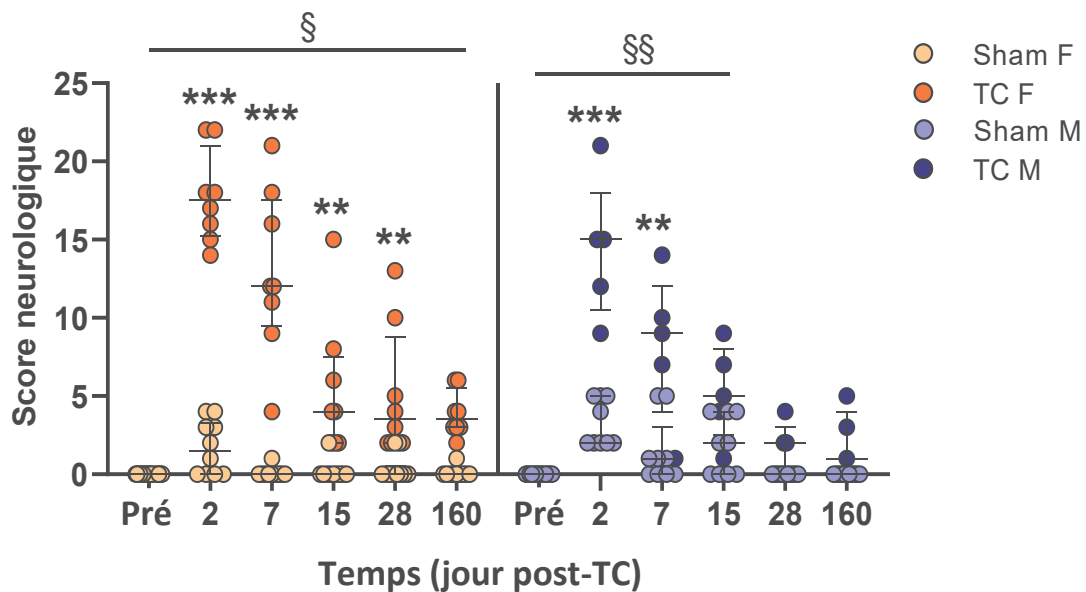


Figure 54. Effet du traumatisme crânien chez les rats femelles et mâles pour le score neurologique sur 160 jours. Le score neurologique a été analysé par une ANOVA à 3 facteurs (groupe x sexe x temps) pour les groupes sham (femelle : $n = 10$, mâle : $n = 9$) et TC (femelle : $n = 8$, mâle : $n = 5$) suivie de tests post-hoc de Bonferroni. ** $p < 0,01$ et *** $p \leq 0,001$ groupe sham versus TC à chaque temps après le traumatisme crânien (TC). § $p < 0,05$ et §§ $p < 0,01$ comparaison du score en fonction de J0 pour les animaux TC. Représentation de la médiane \pm [IQ].

Tableau XIII. Analyses multiples de Bonferroni pour les scores neurologiques chez les animaux traumatisés sévères. F : femelle, M : mâle, TC : traumatisme crânien, en gras $p < 0,05$.

	Temps post-TC (jour)					
	J0	J2	J7	J15	J28	J160
F sham vs TC	> 0,99	< 0,001	< 0,001	0,0013	0,0071	0,191
M sham vs TC	> 0,99	< 0,001	0,001	> 0,99	> 0,99	> 0,99
Sham F vs M	> 0,99	> 0,99	> 0,99	> 0,99	> 0,99	> 0,99
TC F vs M	> 0,99	> 0,99	0,1318	> 0,99	> 0,99	> 0,99
F sham (temps)	-	> 0,99	> 0,99	> 0,99	> 0,99	> 0,99
M sham (temps)	-	0,101	> 0,99	> 0,99	> 0,99	> 0,99
F TC (temps)	-	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,0164
M TC (temps)	-	< 0,001	< 0,001	0,0061	> 0,99	> 0,99

III.3.4.b. Déficits locomoteurs

La fonction locomotrice a été évaluée par le test du rotarod et du GaitLab. Plusieurs rats ont dû être exclus du test du rotarod car ils sautaient ou se laissaient tomber volontairement dès les 10 premières sec de la tige en rotation. Ainsi, les tests réalisés à 15 et 30 jours après le TC ont été éliminés car les rats n'effectuaient plus correctement le test. Nous avons donc seulement conservé les résultats à J2 et J7 après le TC. Les groupes étaient constitués de 8 rats sham et 8 TC pour les femelles, 5 sham et 3 TC pour les mâles. L'ANOVA à 2 facteurs sur mesures répétées a indiqué une interaction entre le temps et le TC pour les femelles ($F(2,28) = 17,59, p < 0,0001$) ainsi que pour les mâles ($F(2, 12) = 6,472, p = 0,012$). Les performances motrices étaient diminuées significativement à J2 ($p < 0,001$) et J7 ($p = 0,035$) pour les femelles TC et seulement à J2 ($p = 0,04$) pour les rats mâles traumatisés (**Figure 55.A**).

La vitesse de la marche mesurée à l'aide du dispositif du GaitLab a aussi révélé un déficit transitoire à J2 et J7 après le TC seulement pour les femelles. Le modèle à effet mixte à 3 facteurs (temps x groupe x sexe) avait montré une interaction significative entre ces trois facteurs ($F(3, 80) = 2,938, p = 0,038$). La vitesse était réduite significativement chez les femelles traumatisées jusqu'à 7 jours après le TC (test de Bonferroni, $p < 0,01$) mais pas chez les mâles (**Figure 55.B**). Toutefois, aucune différence à 155 jours post-TC n'a été mesurée.

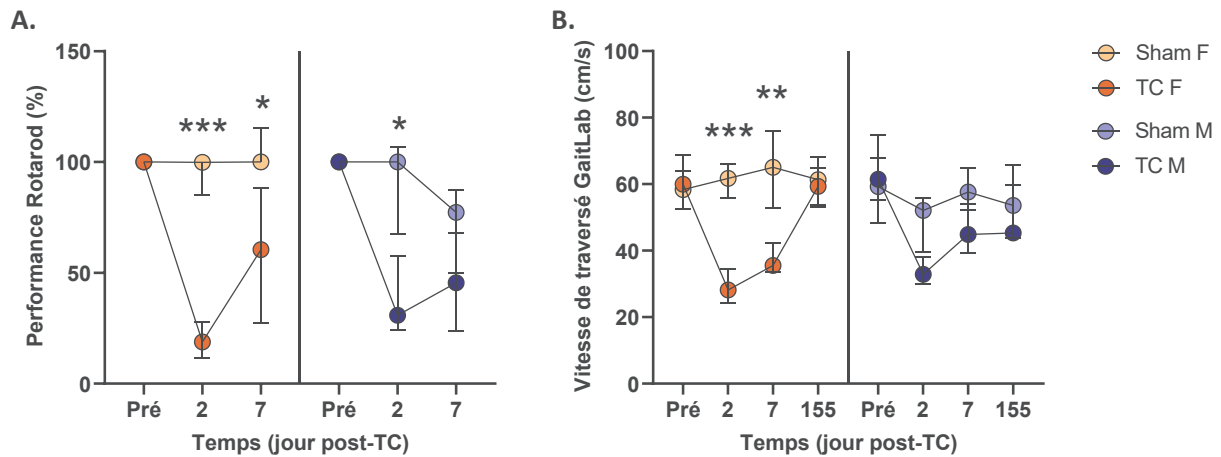
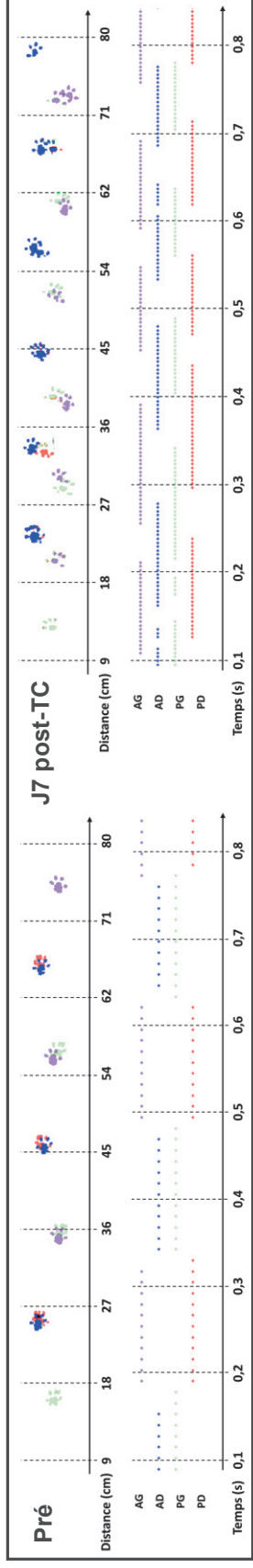


Figure 55. Diminution de la motricité les premiers jours post-traumatisme crânien. **A.** Les groupes TC présentent une performance motrice sur le rotarod amoindrie après le traumatisme-crânien (TC) comparée aux groupes sham (ANOVA à 2 facteurs sur mesures répétées suivie de l'analyse multiple de Bonferroni, $n = 8$ sham et TC femelles, $n = 5$ sham et $n = 3$ TC mâles). **B.** La vitesse de la marche sur le dispositif du GaitLab est diminuée après le TC (modèle mixte sur 3 facteurs à mesure répétée suivie d'une analyse de Bonferroni, $n = 10$ sham, $n = 8$ TC femelles, $n = 9$ sham et $n = 5$ TC mâles). Représentation de la médiane \pm [IQ]. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ sham versus TC.

Nous avons, par la suite, évalué plus finement les paramètres de la marche après le TC. Deux femelles étaient dans l'incapacité à réaliser la traversée à J2 post-TC car elles perdaient l'équilibre et n'avaient pas une marche rectiligne. Aucune différence liée au sexe n'a été rapportée pour les différents paramètres observés. Au deuxième jour après le TC, les femelles traumatisées présentaient une augmentation de la fréquence des foulées (Bonferroni, $p < 0,002$) pour les membres antéro-postérieurs gauches et antérieur droit, une diminution de la longueur des foulées pour les quatre membres ($p < 0,005$) et un temps de contact sur la surface de la passerelle plus long pour les membres antéro-postérieurs droits ($p < 0,05$) et antérieur gauche ($p = 0,001$) par rapport au groupe sham. Sept jours après le TC, la longueur des foulées des quatre membres ($p < 0,003$) et la fréquence de foulée de la patte postérieure gauche étaient significativement différents du groupe sham. Les mâles traumatisés ont seulement présenté une fréquence de foulée du membre postérieur gauche supérieure au groupe sham à J2 ($p = 0,002$). À J155 post-TC aucune différence entre les groupes n'a été mesurée (Figure 56). De plus, le temps de non contact des membres sur la surface, de la base d'appui des membres antérieurs et postérieurs étaient similaires entre les groupes sham et TC.

L'ensemble des données obtenues par ces deux tests a montré que les déficits locomoteurs induits par le TC sévère sont de courte durée et que les performances se normalisent en moins d'une semaine.



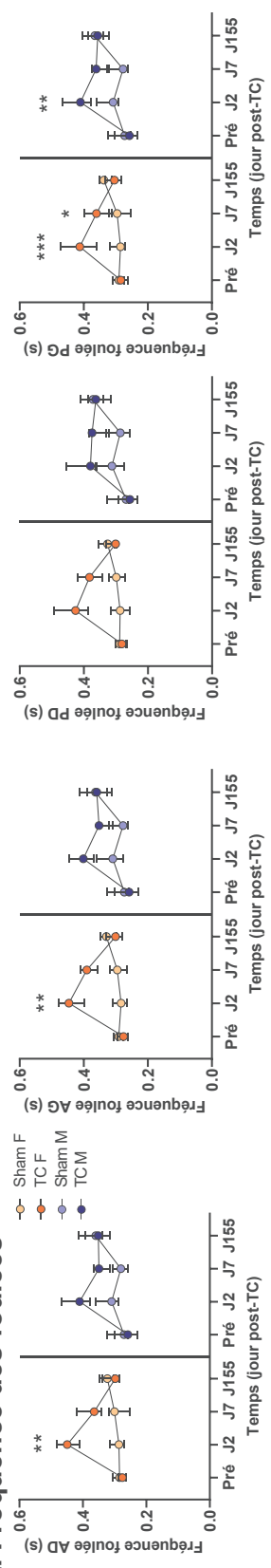
Postérieur gauche

Postérieur droit

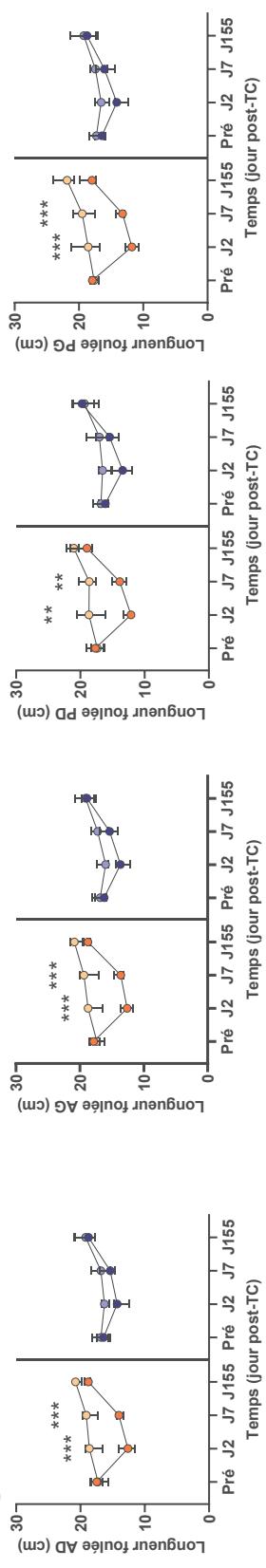
Antérieur gauche

Antérieur droit

A. Fréquence des foulées



B. Longueur des foulées



C. Temps de contact avec la surface

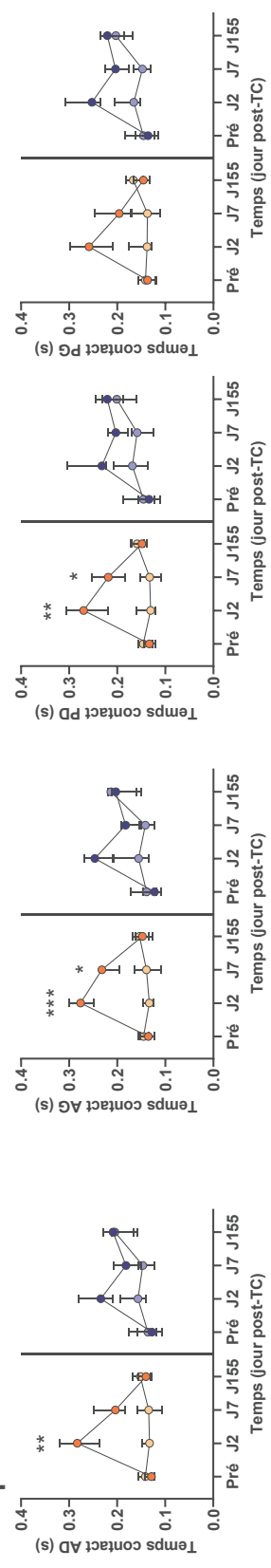


Figure 56. Analyse de la marche chez les rats ayant un traumatisme crânien sévère (TC). L'encadré du haut représente l'analyse de la démarche d'une femelle traumatisée avant et 7 jours après le TC. Les paramètres de la fréquence (A) et la longueur de foulée (B) ainsi que le temps de contact des pattes sur la surface de la passerelle (C) ont été mesurés pour les quatre membres (AD : antérieur droit, AG : antérieur gauche, PD : postérieur droit et PG : postérieur gauche). Un modèle mixte de 3 facteurs sur mesures répétées a été effectué pour chaque configuration suivie par une analyse multiple de Bonferroni. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ sham *versus* TC ; sham femelle (F) $n = 10$, TC F $n = 8$, sham mâle (M) $n = 9$, TC M $n = 5$. Les données sont représentées en médiane \pm [IQ].

III.3.4.c. *Exploration aquatique et mémoire spatiale*

Le test du labyrinthe aquatique a été réalisé dès 115 jours après le TC. Le pourcentage d'animaux trouvant la plateforme dans le groupe femelle sham a augmenté lors des quatre jours d'apprentissage de la tâche pour atteindre 70 % de succès pour trouver la plateforme, tandis que le groupe TC n'était qu'à 37,5 %. Au contraire, le groupe sham mâle montrait une progression plus rapide avec 88,89 % au jour 2 et à 100 % le dernier jour du test. Le groupe mâle TC était de 88 % de rats trouveurs au jour 3 puis à 60 % au jour 4 (Figure 57.A). Ces résultats suggèrent une différence de capacité d'apprentissage entre les femelles et les mâles. Cependant, l'analyse multiple de Bonferroni n'a pas mis en évidence de différence significative entre les traitements, le sexe et les jours de test pour le temps de latence à retrouver la plateforme (Figure 57.B). Au jour 5 (J119 après le TC), le temps passé dans le quadrant où se trouvait la plateforme a été mesuré pour fournir un index de la rétention de la mémoire de la tâche. L'ANOVA à 2 facteurs a indiqué une différence entre les groupes (F (1, 28) = 8,332, $p = 0,007$). Les femelles présentaient un pourcentage de temps similaire dans la zone associée à la plateforme de 32,39 [29,46 – 36,73] % pour les sham et 29,19 [26,81 – 32,22] % pour les animaux traumatisés (Bonferroni, $p = 0,45$). Les mâles traumatisés passaient 28,17 [26,21 – 35,38] % du temps total dans le quadrant contre 42,83 [36,63 – 56,06] % pour le groupe sham (Figure 57.C, $p = 0,021$).

Ainsi, le TC sévère ne semble pas influencer la capacité d'apprentissage à 115 jours après le TC, mais induit un déficit de mémoire chez les mâles.

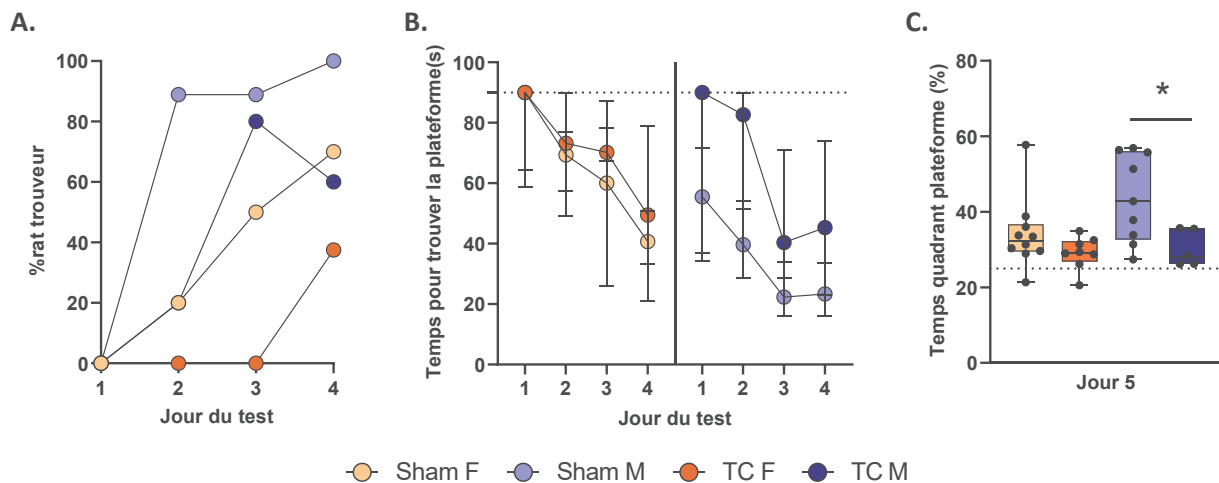


Figure 57. Apprentissage et rétention de la mémoire spatiale à 115 jours après le traumatisme crânien (TC). **A.** Pourcentage des rats femelles (F) et mâles (M) ayant trouvés la plateforme au cours de trois essais consécutifs pour les groupes sham et TC. **B.** Moyenne des trois essais du temps de latence pour trouver la plateforme. La ligne en pointillée correspond à 90 s, au temps total de l'essai. **C.** Temps passé dans le quadrant sans plateforme au jour 5 après l'apprentissage (J119 après le TC). Le trait en pointillé correspond à 25 % du temps total, considéré une durée liée au hasard. L'animal n'a pas mémorisé l'emplacement de la plateforme. ANOVA à 2 facteurs, * < 0,05 sham versus TC ; sham F n : 10, TC F n : 8, sham M n : 9, TC M n : 5. Les données sont représentées en médiane ± [IQ].

III.3.4.d. Effet du TC sévère sur l'anxiété

Le test du zero-maze a été réalisé 8 et 110 jours après TC sévère. Les animaux mâles et femelles ont montré une tendance plus faible dans les distances parcourues et les vitesses de marche à J110 par rapport à J8, et ceci dans les deux zones ZO et ZF. Cet effet n'était pas spécifique au TC, mais pourrait être une conséquence de l'âge des animaux. Aucune différence liée au sexe n'a été relevée. Un phénotype anxieux était révélé par une diminution du temps passé dans la ZO chez les femelles TC par rapport aux sham, à J110 ($p = 0,026$) mais pas à J8 ($p > 0,9$). Cet effet n'a pas été observé chez les mâles (Figure 58.A).

Le test d'exploration aquatique a été réalisé 8 et 110 jours après TC sévère. Les distances parcourues dans l'arène et la vitesse de nage ne présentaient pas de différence significative entre les groupes sham et TC, ni entre les mâles et les femelles. Cela confirmant l'absence de déficits moteurs dans ce test. L'ANOVA à 3 facteurs sur mesures répétées n'a pas révélé de variation entre les femelles et les mâles. Comme dans le précédent test, un phénotype anxieux était révélé chez les femelles traumatisées par une durée diminuée dans la ZC ($p = 0,03$) et une augmentation de la distance parcourue dans la ZE ($p = 0,002$) par rapport aux femelles sham à J110. À J8, seule une augmentation

de la distance parcourue dans la ZE était observée ($p = 0,008$, **Figure 58.B**). **Ce phénotype n'a pas été observé chez les mâles traumatisés. Ainsi, le test du WET confirme les données obtenues par le zero-maze, indiquant un comportement anxieux spécifiquement exprimé par les femelles ayant un TC. Ce caractère tend à s'amplifier au cours du temps.**

L'open-field a été réalisé 145 jours après TC sévère. Les femelles sham et TC ont eu des résultats similaires dans les trois aires (arène totale, ZE, ZC) pour la distance parcourue, le temps passé dans la zone et la vitesse de marche. Le groupe mâle TC avait une distance parcourue supérieure au groupe sham pour l'arène totale et la ZC ($p = 0,024$). De plus, le temps passé dans la ZC était supérieur au groupe sham, ($p = 0,007$). La vitesse d'exploration chez les mâles TC était significativement plus élevée dans l'arène totale et dans la ZE par rapport aux sham (**Figure 58.C**, $p = 0,024$). Ces différences ne révèlent pas d'anxiété, mais plutôt un état d'hyperactivité chez les mâles TC.

L'ensemble de ces tests indiquent que les femelles TC développent un phénotype anxieux dès 8 jours post-TC qui s'est amplifié à 110 jours. Les rats mâles TC ne semblent pas développer ce phénotype.

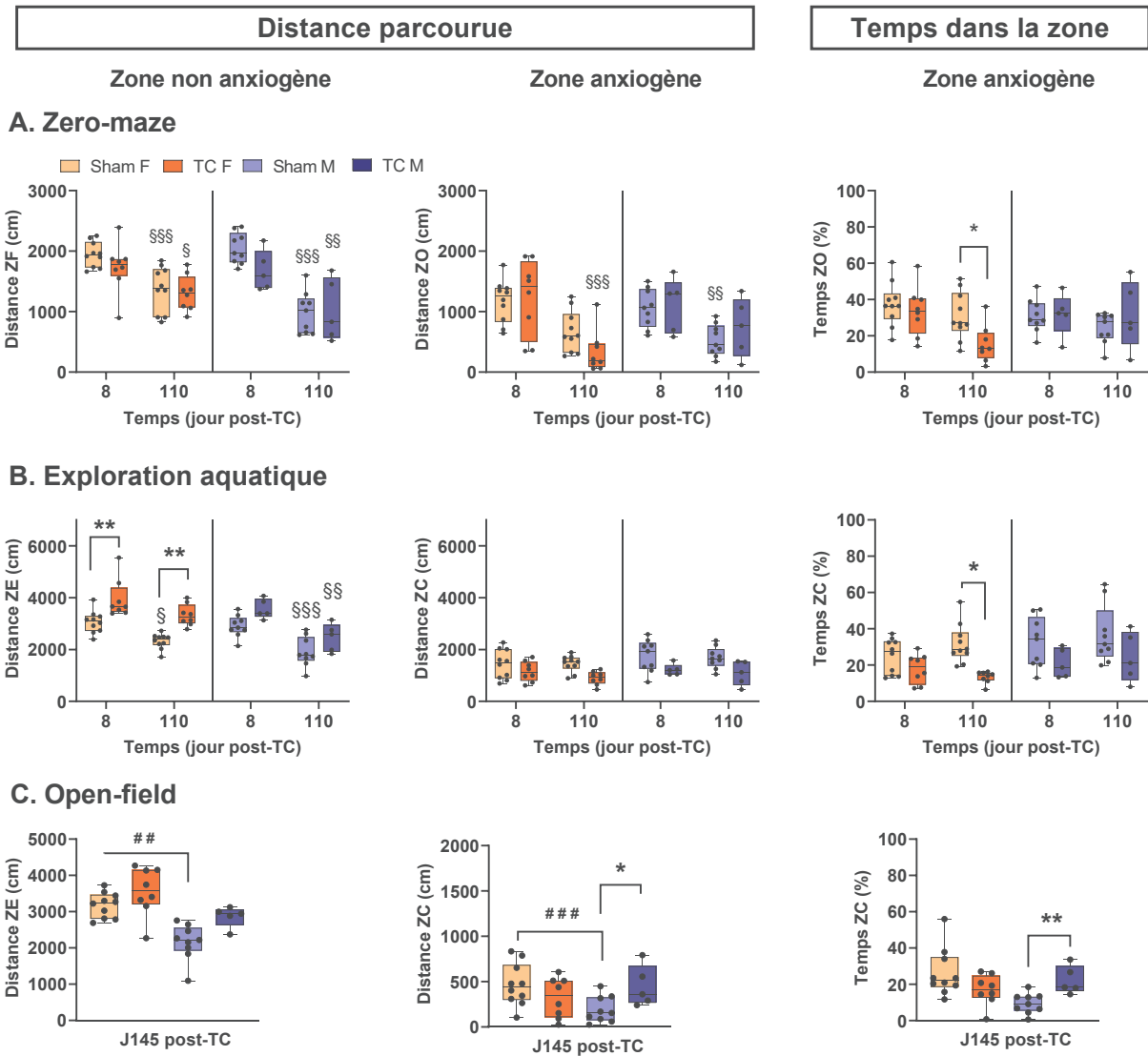


Figure 58. Effet du traumatisme crânien sévère sur l'expression d'un comportement anxieux. Les paramètres de la distance parcourue et du temps passé dans la zone non anxiogène (ZF : zone fermée pour le O-maze, ZE : zone externe pour l'exploration aquatique et l'open-field) et la zone anxiogène (ZO : zone ouverte pour le O-maze, ZC : zone centrale pour l'exploration aquatique et l'open-field) ont été mesurés. Les animaux ont effectué le test du zero-maze (A) et de l'exploration aquatique (B) aux jours 8 et 110 après le traumatisme crânien (TC). À 145 jour post-TC, les animaux ont été introduits dans l'open-field (C) afin d'analyser l'anxiété et leur activité. L'ANOVA à 3 facteurs sur mesures répétées suivie par une analyse multiple de Bonferroni ont été réalisées. Un test de Mann-Withney a été appliqué pour le temps passé dans la ZC de l'open-field. §§§ $p < 0,001$, §§ $p < 0,01$ J8 versus J110 ; ## $p < 0,01$ femelle versus mâle ; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ sham versus TC. Sham F n : 10, TC F n : 8, sham M n : 9, TC M n : 5. Les données sont représentées en médiane \pm [IQ].

III.4. Discussion

Dans cette partie, nous avons cherché à définir sans ambiguïté la sévérité du TC administré aux animaux en fonction de (1) la pression maximale de l'onde de choc sur la dure-mère, (2) la durée de la perte de conscience (réflexes du retrait de la patte et redressement, ainsi que le score de coma pour rat), et (3) le bien-être des rats 4 jours après TC (évalué par notre grille de bien-être développée dans « Résultat – chapitre II »). Conventionnellement, le TC sévère est surtout défini par l'intensité de l'onde de choc, la présence d'un arrêt respiratoire, le temps du retour du réflexe de redressement et par la mortalité élevée au sein de la cohorte. Ainsi, le pourcentage de mortalité peut varier de 33 % à 45-55 % (Ma et al., 2019; Prins et al., 1996; Smith et al., 2018). Cependant, un modèle animal ne peut fonctionner de façon durable avec de tel taux de mortalité. Dans notre étude, nous avons réduit ce taux à moins de 5 % grâce à la ventilation mécanique, l'administration d'un stimulant de la respiration, le Dopram et l'augmentation de la fraction inspirée d'oxygène. Ainsi, la mortalité du modèle ne peut plus être retenue comme un indicateur de sévérité. Notre approche fondée sur les différents aspects de la perte de conscience ainsi que sur le bien-être animal est donc à la fois plus rigoureuse et plus respectueuse de la règle des 3R que les approches précédemment décrites dans la littérature (« Introduction »). La pression maximale de l'onde de choc ne peut pas non plus fournir un index fiable de la sévérité du TC. En se basant sur le score de gravité neurologique à 24 h Smith *et al.* (2018) ont déjà souligné que dans une plage de 3,0 à 3,25 atm la sévérité du TC est peu reproductible, pouvant aller jusqu'à un TC léger. Dans notre étude, deux rats mâles ont subi un TC avec une pression atmosphérique mesurée sur la dure-mère comparable aux autres rats traumatisés. Ils ont néanmoins montré un temps de perte de conscience très réduit ainsi qu'un état de bien être à 4 jours similaire aux animaux sham, confirmant que la pression de l'onde de choc ne peut à elle seule certifier de la sévérité du TC. La déchirure de la dure-mère, une complication fréquente du TC sévère induit par la technique de LFP a aussi été exclue du cadre de notre étude car elle provoque une hernie cérébrale, source de lésions neurologiques non spécifiquement reliées au TC. Cette complication n'est pas ou peu rapportée dans la littérature. L'ensemble de notre approche nous a ainsi conduits à définir le TC sévère avec une plus grande spécificité que ce qui a été rapporté dans la littérature jusqu'à présent, et cela, avec des taux de mortalité spontanée et des mises à mort relativement réduits.

Sur la base de cette meilleure définition du TC sévère, nous avons évalué le comportement des animaux jusqu'à 160 jours après le TC par un panel de tests susceptibles de représenter une grande proportion des caractères pouvant être développés après un TC chez l'Homme sur le long terme (Masel & DeWitt, 2010; Obenaus, 2016; Rabinowitz & Levin, 2014; Walker & Pickett, 2007).

Par l'IRM et l'immunohistochimie, nous avons observé des anomalies cérébrales dès 6 h après le TC jusqu'à 60 jours avec l'apparition d'un hématome intracérébral, des lésions diffuses de la substance blanche au site de l'impact dès deux jours, une dilatation ventriculaire formant une cavité et une déformation hippocampique en ipsilatéral à 7 jour, confirmée par immunohistochimie à 160 jour. De plus, L'immunohistochimie a révélé une diminution du marquage neuronal dans le cortex somatosensoriel mais avec une présence de noyaux pouvant révéler une gliose. Ces résultats encore qualitatifs seront amenés à être complétés dans les mois qui viennent, mais confirment d'ores et déjà d'autres études sur le TC sévère par LFP (Chary et al., 2021; Hayward et al., 2010; Osier et al., 2015; Thompson et al., 2005). Pierce *et al.* (1998) avaient observé une cavité corticale bordée de cellules gliales dès deux semaines après le TC sévère dans le modèle LFP chez le rat. Une atrophie progressive du cortex ipsilatéral avait conduit à une communication entre la cavité formée par celle-ci et le ventricule deux à six mois après la blessure. Une étude récente a noté une perte de densité neuronale avoisinant les 60 % dans cette zone corticale mais aussi de 36 % dans l'aire CA3 hippocampique et de 62 % dans le thalamus dorsal, 7 jours après l'induction d'un TC sévère chez le rat (Balanca et al., 2015). Les noyaux non marqués par NeuN pourraient provenir des cellules gliales notamment de la microglie et de l'activation des astrocytes dans l'implication d'une gliose (Selwyn et al., 2013).

Deux animaux dans notre étude ont présenté des crises tonico-cloniques au cours du mois suivant le TC, pouvant être observées sans instruments. Le dispositif LFP est utilisé dans les modèles d'épilepsie post-traumatique (D'Ambrosio, 2004). Une augmentation de la susceptibilité aux crises un à six mois après la lésion a déjà été rapportée dans ce modèle (Keith & Huang, 2019). Il n'est donc pas surprenant que nos animaux puissent développer des crises. Les patients traumatisés sévères sont les plus concernés dans l'apparition des crises d'épilepsie post-traumatiques au stade précoce (premiers jours) ou tardif par rapport aux formes plus légères de TC (Christensen et al., 2009). L'observation de ces crises tonico-cloniques dans notre modèle confirme encore le caractère sévère du TC induit dans notre étude. Il serait intéressant dans nos futures expériences d'implanter des électrodes corticales afin de quantifier, d'évaluer et de confirmer leur survenue.

Les animaux traumatisés présentaient des scores neurologiques déficitaires jusqu'à 160 jours pour les femelles et 28 jours pour les mâles, reflétant des altérations de la motricité, des réflexes et de l'équilibre en phase subaiguë du TC suivi d'une récupération. McIntosh *et al.* (1989) ont observé ces troubles à quatre semaines après TC sévère par LFP, tandis qu'une autre étude les rapportait jusqu'à deux mois (Pierce et al., 1998). Nous avons ensuite réalisé des tests plus spécifiques permettant d'évaluer les fonctions motrices et mnésiques, ainsi que de l'anxiété.

Les tests du rotarod et du GaitLab ont révélé des déficits locomoteurs au cours de la première semaine mais pas dans la phase chronique après le TC sévère. L'altération motrice a également été rapportée dans d'autres études au cours de la première semaine post-TC (Clough et al., 2007; Hamm et al., 1994). Des études ont utilisé les mesures de vitesse de nage lors du test de MWM, le score du test de la poudre pour la locomotion et l'équilibre et/ou les paramètres moteurs du score neurologique. Les déficits ont été déterminés dès les premiers jours et la récupération des troubles neuromoteurs a été observée plus tardivement à 3 et 6 mois (Pierce et al., 1998; Sell et al., 2017).

La perte de la mémoire et des facultés d'apprentissages sont des problèmes répandus et persistants auxquels sont confrontés les patients après un TC (Obenaus, 2016; Skidmore, 2015). Dans notre étude, nous avons utilisé le test de la piscine de Morris avec un paradigme comportant des mesures intégrées de l'apprentissage ainsi que des mémoires spatiale et de référence (Vorhees & Williams, 2006). Toutefois, nos résultats ne montrent pas de déficits dans la capacité d'apprentissage. En revanche, les rats mâles traumatisés présentaient des troubles de la mémoire lors de l'essai sans la plateforme (phase de rétention au 5ème jour). Dans une étude plus ancienne, Pierce *et al.* (1998) avaient observé une altération des capacités d'apprentissage jusqu'à un an après le TC sévère. Dans une autre étude, la rétention de la mémoire était affectée dès deux semaines et jusqu'à un mois post-TC sévère, néanmoins dans un modèle de TC modéré, ces déficits semblent résolus dès 60 jours (Hayward et al., 2010; Rau et al., 2012; Sun et al., 2007). Il est établi que ce test aquatique est associé aux lésions hippocampiques. Nos résultats suggèrent que ces lésions suite au TC ont un impact plus long terme sur la mémoire, préférentiellement chez les mâles, et pendant plusieurs mois après le TC.

La dépression et l'état d'anxiété sont souvent rapportés chez les patients traumatisés sévères avec une prévalence de 25 à 50 % (Riggio, 2011; Williams et al., 2002). Parmi les trois tests comportementaux utilisés dans notre étude, celui de l'exploration aquatique a montré un phénotype anxieux clair chez les femelles TC, qui a été confirmé par le test du zero-maze. Ce phénotype est apparent à partir du jour 8 et semble s'amplifier 110 jours après le TC sévère. En revanche, il n'a pas d'emblé affecter les mâles. Jones *et al.* (Jones et al., 2008) ont évalué les comportements anxieux et dépressifs à l'aide d'un panel de tests, chez des rats Wistar dans un modèle de TC sévère par LFP. Les animaux présentaient, tout comme dans notre étude, une augmentation de l'état anxieux évident à un et trois mois après la blessure initiale. Ce résultat diffère des TC légers-modérés où l'anxiété est principalement observée dans les premiers moments post-lésionnels suivi d'une amélioration (Kuo et al., 2013).

Une des originalités de ce travail de thèse est la comparaison longitudinale entre les mâles et les femelles. Actuellement, à notre connaissance, peu d'études intègrent les femelles (Gupte et al.,

2019). Pourtant en clinique humaine, le TC touche également les femmes. Nos résultats suggèrent une différence de sévérité suivant le sexe, causée par une pression atmosphérique maximale de l'onde de choc plus élevée au niveau de la dure-mère chez les femelles par rapport aux mâles. Nous avons suggéré dans le chapitre II des résultats que ceci pourrait provenir d'un volume crânial plus important chez les mâles aboutissant à une expansion de fluide en épidual sur une surface supérieure à celle des femelles (Hughes et al., 1978). Malgré cette différence, les animaux des deux sexes ont montré des récupérations de leur état de bien-être ainsi que de leur motricité comparable. Cependant, sur le long terme, les mâles ont montré des troubles de la mémoire tandis que les femelles avaient un phénotype anxieux. Ces résultats indiquent que l'évolution des lésions secondaires consécutives au TC sévère pourrait être différente selon le sexe et entraînerait des séquelles différentes sur le long terme. L'impact du facteur sexe sur les lésions et les déficits post-TC est encore controversé tant en clinique humaine que dans les études précliniques. La littérature a fourni des résultats et un meilleur pronostic pour les femelles, ou pour les animaux femelles, mais d'autres recherches suggèrent que ces altérations sont plus importantes chez l'homme (ou chez les animaux mâles). De plus, certaines études ont démontré aucune différence liée au sexe ou dépendant du paramètre mesuré (Gupte et al., 2019; Spani et al., 2018). Une plus grande attention est nécessaire à l'avenir afin de mieux comprendre les ces différences en incluant une cohorte d'animaux femelles dans les études précliniques.

DISCUSSION GENERALE

Au cours de cette thèse, nous nous sommes tournés vers l'étude du traumatisme crânien (TC) sévère *in vivo*, chez le rat, afin de reproduire les mécanismes moléculaires, cellulaires et tissulaires de la pathologie en prenant en compte l'évolution temporelle des lésions. Notre choix s'est porté sur la technique de percussion latérale de fluide qui comporte des caractères lésionnels retrouvés chez l'Homme comme des lésions focales et diffuses. **L'objectif de cette thèse était de caractériser un modèle de TC sévère chez le rat tant chez les femelles que chez les mâles par cette technique.** Traditionnellement, le TC sévère chez l'animal était associé à une forte mortalité, qui était même considérée comme un des critères permettant de caractériser la sévérité du modèle (Kharatishvili et al., 2006; Ma et al., 2019). Un des enjeux de ce travail de thèse a consisté à raffiner le modèle de TC sévère par LFP pour éliminer cette surmortalité, diminuer et prendre en charge la souffrance post-traumatique et, définir la sévérité du TC sur la base de l'état de conscience de l'animal.

I. Raffinement du modèle de percussion latérale de fluide

Le modèle de TC sévère induit par la technique de LFP a été utilisé à une pression maximale de 5 atm, atténuée au niveau de la dure-mère de l'animal jusqu'à des valeurs de 2,5-2,8 atm. Les raffinements apportés au modèle sont :

- L'introduction d'une tubulure reliant l'animal au réservoir cylindrique du dispositif de LFP. Elle permet d'induire le TC sans déplacer l'animal du cadre stéréotaxique. Des données récentes ont montré l'apparition des DCE quelques minutes après le TC dans des modèles ne nécessitant pas le déplacement de l'animal (Bouley et al., 2019; Pacheco et al., 2019; Von Baumgarten et al., 2008). L'emploi de la tubulure permet de mesurer l'effet physiopathologique du TC dès les premières secondes suivant la blessure mécanique. D'autre part, nous avons observé une diminution proche de 50 % de la pression de l'onde choc entre la colonne d'eau et la craniotomie, ainsi qu'une augmentation de la durée de l'onde de choc, probablement causée par la capacité d'absorption et de déformation de la tubulure. Selwyn *et al.* (2013) ont, quant à eux, déterminé une réduction de 10 fois la pression initiale pour une tubulure de 30 cm de long (0,071 cm de diamètre interne). En plus de cette perte de pression par la tubulure, la propagation de l'onde de choc dans le tissu cérébral est affaiblie, même dans les modèles n'utilisant pas de tubulure. L'étude de Mao *et al.* (2018) ont défini l'impact du fluide sur un modèle *in silico* et ont observé des pressions légèrement inférieures de 10-20 % à la pression initiale, mesurée par le transducteur du LFP. Il est donc impératif de mesurer la pression appliquée au plus proche de la dure-mère.

- L'utilisation de la ventilation mécanique permettant de sauver la plupart des animaux des conséquences de l'arrêt respiratoire induit pas le TC sévère.
- L'administration de doxapram hydrochloride sur la langue et le museau de l'animal afin de stimuler la reprise de la respiration.

Dans ces conditions, la mortalité spontanée n'a été que d'un rat (femelle) sur un total de 23 animaux traumatisés, soit moins de 5 %.

- À ce faible nombre de décès spontanés, ce sont ajoutés quatre animaux présentant une déchirure de la dure-mère accompagnée d'une hernie cérébrale. Il est probable que de telles hernies provoquent des dysfonctionnements importants du cortex sous-jacent, qui ne sont pas spécifiquement reliés au TC sévère. De plus, la lésion de la dure-mère chez ces animaux ne rentre plus dans le cadre d'un modèle de TC non pénétrant et la présence d'une extravasation du tissu cérébral ne permettait pas un réveil de ces animaux dans de telles conditions. Dans notre étude, la déchirure de dure-mère a donc représenté un point limite conduisant à la mise à mort de l'animal. Ce paramètre est fréquemment ignoré (ou peu relaté dans la littérature) et peut mener à inclure des complications supplémentaires par rapport au TC sévère. Les prendre en compte représente un autre type de raffinement du modèle.

Les caractéristiques pathologiques retrouvées dans notre modèle ont été un court arrêt respiratoire compensé par la ventilation mécanique, une diminution du flux sanguin cérébral, une variation transitoire de la fréquence cardiaque, des DCE spontanées, un hématome sous-dural et une perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Au sein de notre laboratoire, une précédente étude avait montré une réduction du flux sanguin cérébral au cours des six heures après le TC dans le modèle LFP (Balança et al., 2017). Cet effet est cohérent par rapport à la pathologie humaine où le débit sanguin cérébral est perturbé. Il est suggéré que cette altération peut provenir d'une perte d'autorégulation ou d'une perméabilité de la BHE, pouvant favoriser une ischémie ou un œdème cérébral (Toth et al., 2016). De nombreuses études précliniques ont observé ce dysfonctionnement de la BHE par histologie ou par IRM. L'invasion de bleu d'Evans dans le parenchyme a été retrouvé dans les zones hémorragiques, c'est-à-dire dans le cortex fronto-pariétal, la capsule externe, dans le gyrus hippocampique ipsilatéral, le corps calleux et dans le ventricule latéral (McIntosh et al., 1989). Les hémorragies ont été observés dès une heure après le TC. L'étude de van Vliet *et al.* (2020) ont montré un dysfonctionnement de la BHE jusqu'à dix mois après le TC par la technique d'IRM. Cette altération de l'unité vasculaire rend favorable la neuro-inflammation médiée par l'infiltration de protéines et de cellules circulantes comme les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes (Werner & Engelhard, 2007).

Dans notre étude, les animaux traumatisés par le LFP ou la valve pneumatique présentaient des DCE spontanées et une majorité d'entre eux avaient également des hématomes sous-duraux et intra-parenchymateux. Il est reconnu que 56 % des patients traumatisés sévère sont sujets aux DCE (Dreier et al., 2016). Ces patients présentent fréquemment des hématomes intracérébraux, des hémorragies sous-arachnoïdiennes (HSA) et des événements ischémiques. De plus, les DCE sont également retrouvées dans ces pathologies (Yağmur et al., 2019). Dans les études sur les DCE post-TC, une grande proportion des patients présentaient des HSA. Il se pourrait donc que ces DCE ne se déclarent non pas à cause du TC en lui-même, mais à la suite de ces HSA (Hartings et al., 2011). Les DCE chez les patients traumatisés sont observés au cours des heures mais aussi 5 à 7 jours après l'accident (Lauritzen et al., 2011). Il serait intéressant d'implanter des électrodes sous-corticales chez les animaux traumatisés par le LFP afin de connaître la cinétique de leurs apparitions.

II. Mise en place d'une grille de bien-être animale spécifique

Le deuxième volet de notre travail de raffinement du modèle de TC sévère consistait à évaluer le bien-être animal à partir d'une grille de score spécifique de la pathologie et, à l'aide de cette grille, à définir des points limites adaptés permettant d'éviter des souffrances excessives ainsi que des mises à mort inutiles. En plus des critères comportementaux et physiologiques généraux comme l'apparence du pelage de l'animal, la présence d'une déshydratation, l'interaction avec son environnement ou ses congénères et le poids, nous avons ajouté les composantes de la respiration, de la locomotion et de la présence de plaies induites par la chirurgie ou par les conséquences du TC. Cette approche nous a permis d'observer un certain nombre de complications comme la pousse excessive des incisives conduisant à une malocclusion. Ce problème était en général révélé par une perte de poids inexplicable ainsi qu'un toilettage récurant du museau et de la bouche. Il a pu être résolu par un limage régulier des incisives sous anesthésie, jusqu'à la reprise d'une usure normale de celles-ci. Nous avons défini des points limites comprenant le score total de la grille, une respiration difficile avec une cyanose tissulaire, une paralysie totale, une blessure corporelle irréversible et un poids inférieur à 30 %. Ce pourcentage est supérieur à ceux fréquemment référencés dans la littérature, avoisinant les 20 % (Morton, 2000; Pinkernell et al., 2016). Cela s'explique par la sévérité du modèle qui amène à une perte de poids prononcée de 20 à 30 % (Eakin et al., 2015). Dans notre modèle, tous les rats ayant perdu jusqu'à 30 % de leur poids initial ont ensuite récupéré un poids dit normal en moins de deux semaines

Ce point limite fixé à 30 % de perte de poids permet donc de limiter le nombre de mise à mort d'animaux, qui auraient pu récupérer un bien-être physiologique.

Avec ces 11 items à noter quotidiennement, cette grille de score représente un investissement en temps qui peut devenir important suivant le nombre d'animaux à évaluer. Cependant, elle est nécessaire pour éviter un déclin de l'état de santé des animaux qui pourrait passer inaperçu et serait observé tardivement. Il faut noter que des systèmes automatisés en continu ont été développés afin de perfectionner les méthodes minimisant la douleur et la détresse des animaux en alertant, dès les signes avant-coureurs, d'une mauvaise santé (Do et al., 2020). Une telle automatisation pourrait représenter un enjeu d'avenir pour le suivi des animaux après un TC sévère.

Notre grille BEA n'a pas été appliquée à d'autres modèles de TC chez l'animal ainsi que d'autres souches, d'espèces de rongeurs, ni à différents âges. Il se peut que des divergences entre les modèles de TC existent, demandant des modifications de la grille que nous proposons. Une perspective d'amélioration de notre grille serait l'établissement d'un index des paliers de score afin de discriminer le TC sévère du modéré, voire du léger. Pour cela, des rats traumatisés légers à modérés seraient utilisés sur la base des critères définis par la littérature et ceux que nous proposons (décrit dans le paragraphe suivant) afin de confirmer la gravité du TC induit et les animaux seraient suivis quotidiennement avec notre grille.

III. Caractérisation longitudinale du traumatisme crânien sévère chez le rat

III.1. Inclusion et sévérité du traumatisme crânien

L'inclusion/exclusion des animaux après induction du TC est un critère important pour étudier spécifiquement le TC sévère et écarter des formes de TC plus légères ainsi que d'autres pathologies comme les lésions de la dure-mère. Grâce à nos efforts de raffinement, la mortalité des animaux est tombée à moins de 5 % et ne peut plus être considérée comme un critère de sévérité. De plus, ce taux est calculé sur une population alors que la sévérité du TC doit être définie de façon individuelle. La pression maximale de l'onde de choc a été définie dans notre travail à 5 atm au niveau du réservoir du LFP et à 2,5-2,8 atm au niveau du site de la craniotomie. Ma *et al.* (2019) ont également proposé des valeurs supérieures à 2,5 atm pour le TC sévère. Toutefois, certaines études indiquent des pressions de 2,3 atm jusqu'à 4 atm (Chitturi et al., 2018; D'Ambrosio, 2004; Kinoshita et al., 2002; Nnode-Ekane et al., 2019). Cependant, ce paramètre ne suffit pas à définir un TC sévère. Ainsi, dans notre étude,

quatre rats (sur un total de 23) ont été exclus car ils présentaient un comportement proche de celui des rats sham. Nous avons donc privilégié une définition du TC sévère sur la base de l'état de conscience de l'animal, notamment du délai de retour des réflexes du retrait de la patte et de redressement, ainsi que du score de coma normal (RCS, retour à 13). Le bien-être de l'animal quatre jours après le TC était un facteur discriminant entre les rats TC sévère et les trois animaux ayant présenté un retour à la conscience rapide. En plus de la pression induite et du taux de mortalité, certaines études intègrent le temps de l'arrêt respiratoire et le score neurologique aux temps précoces après la lésion (D'Ambrosio, 2004; Immonen et al., 2009; Sell et al., 2017; Smith et al., 1997). Cependant, il existe une grande variabilité entre les laboratoires pour définir leurs seuils, et parfois, entre les expériences au sein d'une même équipe. Pour notre part, nous avons choisi d'utiliser l'échelle de Coma du Rat déterminée par Pais-Roldan *et al.* (2019) qui englobe non pas un mais une combinaison de réflexes, et des indicateurs physiologiques propre à l'espèce. Cette grille définit la perte de conscience des rats et peut être utilisée comme analogue à celle de l'Homme, l'échelle de Coma de Glasgow. Le panel de paramètres proposé permet un suivi en continu dès le TC jusqu'à une récupération totale de la conscience.

D'autres tests semi quantitatifs ont été utilisés par le passé pour définir le TC sévère. Smith *et al.* (2018) ont choisi un score neurologique supérieur à 10 à 24 h post TC, définissant l'inclusion des rats traumatisés dans leur modèle LFP sévère. Ils l'ont comparé à la pression induite, par une régression linéaire, révélant une mauvaise corrélation. Cela suggère d'une gamme de gravité du TC plus complexe ne pouvant être définie par la pression seule (Reid et al., 2016).

Un des principaux apports de cette thèse consistait à définir des critères objectifs pour caractériser le TC sévère : un temps de reprise de conscience supérieur à 40 min sur la base du RCS, un retour du réflexe de retrait de la patte supérieur à 10 min, un retour du réflexe de redressement supérieur à 25 min et un score de bien être à quatre jour supérieur à 10. Cette meilleure définition du TC sévère, par rapport aux formes modérées et légères, devrait contribuer à mieux cerner cette pathologie et à la reproduire plus fidèlement chez l'animal à l'avenir. Afin de compléter l'étude, il serait intéressant d'établir l'évolution de l'état de conscience des animaux traumatisés légers et modérés à partir de la grille de Coma pour rat.

III.2. Epilepsie post-traumatique

Lors de nos travaux réalisés au cours de cette thèse, nous avons observé des crises tonico-cloniques chez deux animaux traumatisés à partir d'un mois jusqu'à 5,5 mois après le TC. Le modèle LFP est l'un des plus utilisés dans le cadre des études sur l'épilepsie post-traumatique (Keith & Huang, 2019). Les patients traumatisés sévères présentent un fort risque de développer cette pathologie.

L'épilepsie est donc un marqueur de gravité du TC (Christensen et al., 2009; Sharma et al., 2021). La susceptibilité aux crises chez les animaux est souvent mesurée par un test d'injection du chimioconvulsant pentylènetétrazole, un antagoniste des récepteurs GABA-a (Squires et al., 1984). Elle a été montrée à un mois et jusqu'à six mois chez les rongeurs (Keith & Huang, 2019; Mukherjee et al., 2013). Des crises convulsives spontanées ont été enregistrées par vidéo couplé à l'électroencéphalographie (EEG) à partir de deux semaines post-TC, puis d'une installation de l'épilepsie chronique à la 6^{ème} semaine (Smith et al., 2018). Andrade *et al.* (2019) ont enregistré dans ce modèle 59 % de crises épileptiformes non convulsives par l'EEG à 72 h après le TC. Cela suggère que nos animaux ont également pu développer de telles crises sans que nous puissions les observer car nous n'avons pas intégré d'étude par EEG dans notre projet.

L'une des principales hypothèses du développement de ces crises est d'origine neuro-inflammatoire (Webster et al., 2017). Nous avons observé par histologie une perméabilité de la BHE suite à l'injection intrapéritonéale de bleu d'Evans. Cette molécule se lie aux protéines circulantes, en particulier à l'albumine. Nous avons décrit dans l'introduction qu'en conditions pathologiques où la BHE est perméabilisée, cette protéine peut se fixer aux récepteurs membranaires TGF- β 2, notamment des astrocytes et de la microglie, ce qui engendre la synthèse et la libération de cytokines pro-inflammatoires telle que IL-1 β (Weissberg et al., 2015). Ces cytokines peuvent affecter les jonctions serrées endothéliales de la BHE favorisant sa perméabilité (Pan et al., 2011). L'étude de l'épilepsie post-traumatique dans notre modèle de TC sévère pourrait être un des prolongements de cette thèse.

III.3. Déficits moteurs

Les patients traumatisés sévères présentent des troubles moteurs jusqu'à un handicap physique persistant dans le temps (Walker & Pickett, 2007). Nous avons donc intégré des tests de motricité dans notre étude par l'utilisation du test de rotarod, du GaitLab, ainsi que du score neurologique de sévérité intégrant certains items comme la marche spontanée, le comportement rotatoire, la résistance à la poussée latérale et la flexion des membres. Les deux premiers tests comportementaux ont montré une altération de la locomotion de 2 à 7 jours après le TC chez les rats, principalement chez les femelles, mais d'aucun déficit à 155 jours. Le score neurologique était différent entre les groupes sham et TC jusqu'à 28 jours chez les femelles traumatisées et à 7 jours pour les mâles. Ainsi, les animaux présentaient des difficultés motrices dans la phase aiguë-subaiguë après le TC mais aucun déficit de long terme. Dans la littérature, des études précliniques montrant des altérations motrices sur le long terme sont peu nombreuses. Pierce *et al.* (1998) ont observé des déficits fins par le score neurologique, révélés plus précisément par une flexion controlatérale du membre antérieur droit considérée comme anormale. Les animaux traumatisés présentaient cette flexion jusqu'à un an

après le TC sévère (pression de l'onde de choc de 2,7 à 3,1 atm). Une autre étude a montré des déficits dans le test du rotarod et dans la tâche de la poutre, jusqu'à 5 jours et qui ont persisté jusqu'à 6 semaines après la lésions chez le rat (Hamm et al., 1994). Dans notre cas, la réalisation du test du rotarod s'est heurtée à des problèmes de motivation des animaux qui pourrait être due à une mauvaise adaptation du dispositif à la taille de nos rats relativement âgés. Dans l'ensemble, nos résultats indiquent une excellente récupération motrice des animaux après un TC sévère, ce qui est une différence majeure avec les données cliniques qui rapporte une forte proportion de patients gardant un handicap moteur persistant. Cette différence pourrait être due à la très grande plasticité cérébrale des rongeurs, ainsi qu'à de très bonnes capacités régénératives par rapport aux humains.

III.4. Déficits cognitifs

Nous avons évalué l'apprentissage et la mémoire spatiale au sein de nos cohortes de rats à 115 jours après le TC à l'aide du test de la piscine de Morris (*Morris Water Maze*). En clinique, les patients traumatisés sévères présentent des déficits cognitifs de long terme (Obenaus, 2016; Skidmore, 2015). Dans notre étude, les animaux sham et traumatisés n'ont pas présenté de différence d'apprentissage. Toutefois, le pourcentage de rats mâles du groupe sham trouvant la plateforme étaient plus élevés que les femelles sham qui ont montré des capacités d'apprentissage réduites. Les effets du TC sévère sur la mémoire et l'apprentissage était difficiles à mettre en évidence chez les femelles. Des études plus anciennes ont montré des déficits cognitifs dans ce test chez les animaux traumatisés dès trois jours et jusqu'à un an après le TC (Pierce et al., 1998; Sell et al., 2017). L'utilisation de ce test implique les zones cérébrales hippocampiques tels que le CA3, le gyrus denté, le subiculum, mais aussi le cortex entorhinal et les noyaux profonds (Garthe & Kempermann, 2013). L'étude de Jarrard *et al.* (2004) s'est intéressé à l'implication à ces structures afin de les apparenter à des fonctions cognitives. Ils ont ainsi observé que l'hippocampe et les zones pré- et para-subiculum sont impliquées dans le traitement des informations spatiales. Le cortex périrhinal et postrhinal ont un rôle spécifique dans la mémorisation des informations à court terme, tandis que le cortex entorhinal serait lié à l'apprentissage de la discrimination spatiale complexe nécessitant la mémoire de référence. De ce fait, les animaux présentant des lésions dans ces structures ne trouveront pas la plateforme et donc auront une altération de l'apprentissage et de la mémoire spatial, ainsi que de la mémoire référentielle. Au sein de notre équipe, Balança *et al.* (2015) ont mesuré une perte de densité neuronale chez le rat sept jours après le TC dans le thalamus dorsal et dans l'aire CA3 de l'hippocampe. Grâce à l'IRM et à l'immunohistologie, nous avons observé une déformation de l'hippocampe pouvant expliquer la présence de ces dommages chez les mâles. Cela suggère que les déficits cognitifs chez les mâles pourraient provenir de lésions hippocampiques.

III.5. Comportement anxieux

Les caractères anxieux et dépressif sont fréquemment observés chez les patients traumatisés sévères (Riggio, 2011; Williams et al., 2002). Nous avons établi un protocole pour mesurer le comportement anxieux chez nos animaux traumatisés. Pour cela, trois tests comportementaux ont été mis en œuvre : le zero-maze, l'exploration aquatique et l'open-field. De plus, l'open-field est aussi utilisé pour mesurer l'activité générale des animaux. Seul l'exploration aquatique a mis en avant un comportement anxieux et seulement chez les femelles à partir du jour 8. Ce comportement a ensuite été retrouvé au jour 120 après le TC dans les tests de l'exploration aquatique et du zero-maze. Concernant le groupe mâle traumatisé, les rats avaient un comportement hyperactif à 145 jours après la lésion (open-field) mais pas de signe clair d'anxiété. Jones *et al.* (2008) ont également mis en évidence un phénotype anxieux à un et trois mois après le TC, et jusqu'à six mois par l'utilisation de plusieurs tests comportementaux. Cependant, d'autres études n'ont pas observé de comportement anxieux dans cette même période pour le TC sévère (Lapinlampi et al., 2020; Shultz et al., 2013; Shultz et al., 2011).

Il existe différentes forme d'anxiété. Tout d'abord, l'anxiété d'état correspond à une angoisse du sujet à un moment donnée face à une menace précise. Le second type est l'anxiété de trait qui est considérée comme durable et non spécifique. Ces deux types d'anxiété peuvent être observés chez les rats suivant les tests comportementaux utilisés. Ainsi, le zero-maze et l'exploration aquatique testent une anxiété d'état, tandis que l'open-field est associé à l'anxiété de trait (Goes et al., 2009; Malkesman et al., 2013). Goes *et al.* (2009) n'ont pas trouvé de corrélation entre ces deux aspects anxieux chez des rats sains, indiquant une indépendance de ces deux phénotypes. Cela signifie que des animaux présentant un comportement anxieux de trait n'ont pas forcément celui d'état, et inversement.

Dans l'ensemble nos résultats indiquent la persistance d'un état anxieux dans notre modèle de TC sévère chez le rat, surtout exprimé chez les femelles.

III.6. La variable sexuelle dans le traumatisme crânien

Lors de nos deux études sur l'effet longitudinale du TC (chapitres II et III des résultats), nous avons observé certaines divergences entre les animaux traumatisés de sexe différent. Les femelles avaient une pression de l'onde de choc au site de la craniotomie significativement plus élevée que les mâles, des temps de récupération du réflexe de redressement et du retour d'un état de bien-être physiologique plus long, ainsi qu'un score plus élevé de celui à quatre jours. De plus, les femelles traumatisées sévères présentaient une tendance plus marquée à des déficits moteurs et d'un comportement anxieux. Les mâles traumatisés, quant à eux, étaient hyperactifs lors de l'essai avec

l'open-field au jour 145 post-TC. Nous avons soumis l'hypothèse qu'une partie de ces différences liées au sexe pourrait provenir de la taille du crâne des animaux (Hughes et al., 1978). Les mâles ont un volume crânien supérieur aux femelles ce qui pourrait influencer la propagation du fluide délivré par le LFP dans la cavité épurale. Le sérum physiologique pourrait s'épandre sur la dure-mère et ainsi comprimer le tissu cérébral sur une plus grande surface avec une répartition des forces étendue, contrairement aux femelles où ce phénomène serait localisé, engendrant des lésions plus conséquentes avec une différence des zones atteintes. Afin de mieux comprendre cette variation, une étude par imagerie devra être menée et approfondie afin de quantifier et de répertorier les dommages tissulaires. Il est reconnu que la taille des animaux peut influencer les lésions et qu'il est vivement recommandé d'harmoniser les poids des animaux lors de leur répartition dans les groupes (sham et traumatisé). Cependant et comme nous l'avons montré dans nos travaux sur le bien-être animal, les mâles ont un poids plus élevé que les femelles pour une même tranche d'âge (10 semaines) de par leur physiologie. Nous avons souhaité garder un âge identique au détriment du poids afin de modéliser un TC chez le jeune adulte pour mesurer l'évolution des déficits sur plusieurs mois. Comme décrit dans l'introduction, la prévalence du TC chez l'Homme est élevée chez l'enfant, le jeune adulte et chez les personnes âgées (Faul & Coronado, 2015; James et al., 2019).

Pendant longtemps, peu de recherches ont intégré les femelles, quelle que soit l'espèce, par l'argumentaire de l'implication hormonale qui pourrait biaiser les résultats. Späni *et al.* (2018) ont rapporté que seulement 5 à 7 % des études précliniques intégraient les deux sexes et 4 à 6 % se sont concentré sur les animaux femelles contre 77 à 80 % pour les mâles entre 2011 et 2016. Cependant, l'utilisation exclusive de mâles ne reflètent pas la réalité des pathologies humaines qui touchent les hommes et les femmes. Dans le cas de la recherche sur le TC, aucun consensus n'est clairement défini sur la différence des sexes. Certaines études cliniques et animales ont observé un meilleur pronostic vital chez l'homme (ou les mâles pour les animaux), d'autres chez la femme (femelles), tandis que certaines ont observé soit aucune différence soit des résultats mitigés. Gupte *et al.* (2019) ont référencé et classé les articles traitant l'implication des paramètres sexuels et du TC. Comme décrit dans l'introduction, ils ont rapporté de moins bons résultats pour les femmes toutes sévérités confondues mais d'un meilleur pronostic dans le cas du TC sévère. Concernant l'ensemble des données animales, les femelles présentaient moins de déficits que les mâles dans 44 % de publications, même dans le cas du TC modéré-sévère (55 %). Toutefois, 42 % des études n'ont pas établi de pronostic favorable à l'un des sexes. Dans le cas du modèle LFP, ce résultat n'était pas retrouvé dans trois articles (sur un total de cinq) montrant des déficits plus important chez les femelles que chez les mâles.

Depuis longtemps, l'idée a été soutenue de l'effet neuro-protecteur des hormones sexuelles féminines dans certaines études précliniques, dont la progestérone. C'est une hormone stéroïdienne

sécrétée par les cellules du corps jaune des ovaires et du placenta. Dans des modèles de lésions neurologiques, il a été montré qu'elle avait des effets multifactoriels comprenant l'inhibition des cytokines inflammatoires, la réduction de l'apoptose, la prévention de l'excitotoxicité et le contrôle de l'œdème vasogénique. Malgré cela, les essais clinique testant son utilisation ont échoué ou ont montré très peu de résultats positifs (Lu et al., 2016; Spani et al., 2018; Stein, 2015).

Il est maintenant recommandé d'intégrer les animaux femelles dans les futures études pour comprendre si de tels différences existent. Pour cela, des critères sont importants afin de contrôler les différents paramètres comme l'âge des animaux, la taille et les différences de motivations à effectuer des tâches comportementales. De plus, le cycle œstral pourrait être contrôlé par une ovariectomie, un verrouillage temporel ou par une mesure des taux hormonaux, afin d'induire le TC à la même période (ou état hormonal) pour les femelles.

III.7. Anomalies cérébrales observées par imagerie et perceptives

Nous avons réalisé une étude longitudinale par un suivi IRM au cours des deux mois après l'induction du TC. L'imagerie a révélé des anomalies cérébrales qui progressent dans le temps tels que des lésions de la substance blanche dans le corps calleux, un hématome intra-parenchymateux, une dilatation ventriculaire et une déformation ipsilatérale de l'hippocampe. Ces événements physiopathologiques dans ce modèle LFP ont été rapportés dans la littérature (Iwamoto et al., 1997; Liu et al., 2010; San Martín Molina et al., 2020; van Vliet et al., 2020). En plus de ces données anatomiques, nous avons effectué des séquences d'IRM spécifiques pour l'observation de la substance blanche (tenseur de diffusion), de la perméabilité de la BHE (injection d'un agent de contraste couplée à une séquence T1-FLASH) et de la perfusion cérébrale (injection de gadolinium avec une séquence en T2 écho planaire) afin de compléter la compréhension évolutive des perturbations tissulaires retrouvées dans ce modèle. Toutefois, ces résultats n'ont pas été présentés dans ce manuscrit et feront prochainement l'objet d'un traitement approfondi afin de caractériser pleinement notre modèle. L'intérêt de ce projet permettra une corrélation entre les lésions cérébrales et les déficits retrouvés.

Enfin, une étude immunohistologique sera également réalisée pour cartographier et mesurer à 160 jours après le TC les populations cellulaires présentes dans les régions précocement lésées. Comme mentionnée précédemment, Balança *et al.* (2015) ont mesuré une diminution de la densité neuronale dans différentes régions notamment hippocampiques et dans le cortex somatosensoriel. Dans cette dernière structure, nous avons également observé un marquage moins dense des neurones. Il serait intéressant de quantifier le nombre de cellules neuronales et de mesurer les nouvelles cellules afin de mettre en évidence une neurogenèse éventuelle. De plus, cette zone est sujette à une activation des astrocytes et de la microglie. Il a été rapporté qu'une neuroinflammation

peut être active sur plusieurs mois (Ng & Lee, 2019). Notre objectif sera également de quantifier la population astrocytaire et microgliale pour déterminer si ces régions impactées présentent de telles caractéristiques à 160 jour après le TC.

IV. Conclusion générale

Le traumatisme crânien (TC) sévère est une pathologie hétérogène impliquant de nombreux mécanismes physiopathologiques. Les patients atteints d'un TC sévère présentent de lourdes séquelles motrices, comportementales, cognitives, psychologiques et sociales. Il est donc important de distinguer le TC sévère des autres formes plus légères. Des modèles *in vivo* ont été développés afin de comprendre les mécanismes sous-jacents des lésions survenant à la suite de l'accident traumatique dans leur entièreté. L'intérêt de ces travaux de thèse réside dans le raffinement et la caractérisation du modèle par percussion latérale de fluide (LFP) chez le rat. Une première étude visait à remplacer l'appareil LFP pour se séparer de ces contraintes d'encombrement, de calibrage, d'homogénéité des lésions et du déplacement des animaux. Une valve pneumatique a été utilisée pour répondre à ces besoins. Malgré les ressemblances pathologiques avec le dispositif initial, il fût abandonné au vu de l'introduction de lésions de la dure-mère. Cependant, l'utilisation d'une tubulure reliant l'appareil LFP à l'animal a été conservée pour limiter son déplacement. Ensuite, une deuxième étude s'est penchée sur la question de la gravité du modèle au regard de l'éthique animal. Une grille de bien-être animal spécifique au TC sévère a été développée pour quantifier quotidiennement et prendre en charge rapidement la souffrance des animaux. La détérioration du bien-être animal était transitoire et se rééquilibrait sur les deux semaines après l'induction du TC. Enfin, une dernière étude s'est portée sur l'évolution temporelle des lésions et des séquelles post-traumatiques comportementales et neurologiques mesurées sur 160 jours. Les animaux traumatisés présentaient des déficits moteurs précoces mais non durables, des dommages neurologiques, cognitifs et un comportement anxieux sur le long terme. De plus, des disparités entre les animaux mâles et femelles ont été observés avec une tendance à une sévérité plus marquée chez les femelles. De ce fait, ces résultats ont permis de mieux définir le modèle de TC sévère chez le rat et ouvrent la voie vers une meilleure prise en compte de la spécificité du TC sévère dans les études précliniques.

BIBLIOGRAPHIE

- Adatia, K., Newcombe, V. F. J., & Menon, D. K. (2021). Contusion Progression Following Traumatic Brain Injury: A Review of Clinical and Radiological Predictors, and Influence on Outcome. *Neurocritical Care*, 34(1), 312-324. <https://doi.org/10.1007/s12028-020-00994-4>
- Agoston, D. V., Vink, R., Helmy, A., Risling, M., Nelson, D., & Prins, M. (2019). How to Translate Time: The Temporal Aspects of Rodent and Human Pathobiological Processes in Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*, 36(11), 1724-1737. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.6261>
- Ahmed, S., Venigalla, H., Mekala, H. M., Dar, S., Hassan, M., & Ayub, S. (2017). Traumatic Brain Injury and Neuropsychiatric Complications. *Indian J Psychol Med*, 39(2), 114-121. <https://doi.org/10.4103/0253-7176.203129>
- Akamatsu, Y., & Hanafy, K. A. (2020). Cell Death and Recovery in Traumatic Brain Injury. *Neurotherapeutics*, 17(2), 446-456. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00840-7>
- Albert-Weissenberger, C., & Sirén, A.-L. (2010). Experimental traumatic brain injury. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2(1), 16. <https://doi.org/10.1186/2040-7378-2-16>
- Almulhim, A. M., & Madadin, M. (2021). Scalp Laceration. Dans *StatPearls*. StatPearls Publishing
- Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.
- Andersson, S., Krogstad, J. M., & Finset, A. (1999). Apathy and depressed mood in acquired brain damage: relationship to lesion localization and psychophysiological reactivity. *Psychol Med*, 29(2), 447-456. <https://doi.org/10.1017/s0033291798008046>
- Andrade, P., Banuelos-Cabrera, I., Lapinlampi, N., Paananen, T., Cizek, R., Ndode-Ekane, X. E., & Pitkänen, A. (2019). Acute Non-Convulsive Status Epilepticus after Experimental Traumatic Brain Injury in Rats. *J Neurotrauma*, 36(11), 1890-1907. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.6107>
- Andresen, M., Gazmuri, J. T., Marín, A., Regueira, T., & Rovegno, M. (2015). Therapeutic hypothermia for acute brain injuries. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*, 23(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13049-015-0121-3>
- Andriessen, T. M., Horn, J., Franschman, G., van der Naalt, J., Haitsma, I., Jacobs, B., . . . Vos, P. E. (2011). Epidemiology, severity classification, and outcome of moderate and severe traumatic brain injury: a prospective multicenter study. *J Neurotrauma*, 28(10), 2019-2031. <https://doi.org/10.1089/neu.2011.2034>
- Andriessen, T. M. J. C., Jacobs, B., & Vos, P. E. (2010). Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(10), 2381-2392. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01164.x>
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01164.x>
- Animal Testing. (2018). *L'expérimentation animale à travers l'Histoire*. <https://animaltesting.fr/4219-lexperimentation-animale-a-travers-lhistoire>
- Annegers, J. F., Hauser, W. A., Coan, S. P., & Rocca, W. A. (1998). A population-based study of seizures after traumatic brain injuries. *N Engl J Med*, 338(1), 20-24. <https://doi.org/10.1056/nejm199801013380104>
- Armstead, W. M. (2016). Cerebral Blood Flow Autoregulation and Dysautoregulation. *Anesthesiology Clinics*, 34(3), 465-477. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anclin.2016.04.002>
- Arulsamy, A., Corrigan, F., & Collins-Praino, L. E. (2019). Cognitive and neuropsychiatric impairments vary as a function of injury severity at 12 months post-experimental diffuse traumatic brain injury: Implications for dementia development. *Behavioural Brain Research*, 365, 66-76. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.02.045>
- Asehnoune, K., Roquilly, A., & Cinotti, R. (2018). Respiratory Management in Patients with Severe Brain Injury. *Crit Care*, 22(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s13054-018-1994-0>
- Ashman, T. A., Gordon, W. A., Cantor, J. B., & Hibbard, M. R. (2006). Neurobehavioral consequences of traumatic brain injury. *Mt Sinai J Med*, 73(7), 999-1005.
- Atkinson, J. L., Anderson, R. E., & Murray, M. J. (1998). The early critical phase of severe head injury: importance of apnea and dysfunctional respiration. *J Trauma*, 45(5), 941-945. <https://doi.org/10.1097/00005373-199811000-00016>

- Badri, S., Chen, J., Barber, J., Temkin, N. R., Dikmen, S. S., Chesnut, R. M., . . . Treggiari, M. M. (2012). Mortality and long-term functional outcome associated with intracranial pressure after traumatic brain injury. *Intensive Care Med*, 38(11), 1800-1809. <https://doi.org/10.1007/s00134-012-2655-4>
- Balanca, B., Bapteste, L., Lieutaud, T., Ressnikoff, D., Guy, R., Bezin, L., & Marinesco, S. (2015). Neuronal Loss as Evidenced by Automated Quantification of Neuronal Density Following Moderate and Severe Traumatic Brain Injury in Rats. *Journal of neuroscience research*, 94. <https://doi.org/10.1002/jnr.23676>
- Balança, B., Meiller, A., Bezin, L., Dreier, J. P., Marinesco, S., & Lieutaud, T. (2017). Altered hypermetabolic response to cortical spreading depolarizations after traumatic brain injury in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 37(5), 1670-1686. <https://doi.org/10.1177/0271678x16657571>
- Balentine, J. D., Greene, W. B., & Bornstein, M. (1988). In vitro spinal cord trauma. *Lab Invest*, 58(1), 93-99.
- Bar-Kochba, E., Scimone, M. T., Estrada, J. B., & Franck, C. (2016). Strain and rate-dependent neuronal injury in a 3D in vitro compression model of traumatic brain injury. *Scientific Reports*, 6(1), 30550. <https://doi.org/10.1038/srep30550>
- Barman, A., Chatterjee, A., & Bhide, R. (2016). Cognitive Impairment and Rehabilitation Strategies After Traumatic Brain Injury. *Indian J Psychol Med*, 38(3), 172-181. <https://doi.org/10.4103/0253-7176.183086>
- Bayne, K., Bayvel, A. C. D., & Williams, V. (2013). Chapter 6 - Laboratory Animal Welfare: International Issues. Dans K. Bayne & P. V. Turner (édit.), *Laboratory Animal Welfare* (p. 55-76). Academic Press.
- Becker, L. B. (2004). New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res*, 61(3), 461-470. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.10.025>
- Belmont, A., Agar, N., Hugeron, C., Gallais, B., & Azouvi, P. (2006). Fatigue and traumatic brain injury. *Ann Readapt Med Phys*, 49(6), 283-288, 370-284. <https://doi.org/10.1016/j.annrmp.2006.04.017>
- Beni-Adani, L., Gozes, I., Cohen, Y., Assaf, Y., Steingart, R. A., Brenneman, D. E., . . . Shohami, E. (2001). A Peptide Derived from Activity-Dependent Neuroprotective Protein (ADNP) Ameliorates Injury Response in Closed Head Injury in Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 296(1), 57. <http://jpet.aspetjournals.org/content/296/1/57.abstract>
- Berrout, J., Jin, M., & O'Neil, R. G. (2012). Critical role of TRPP2 and TRPC1 channels in stretch-induced injury of blood-brain barrier endothelial cells. *Brain Research*, 1436, 1-12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.11.044>
- Bertullo, G. (2015). History of Traumatic Brain Injury (TBI). *AJBM* 3(7), 28. <https://doi.org/10.18081/2333-5106/015-07/381-409>
- Bodnar, C. N., Roberts, K. N., Higgins, E. K., & Bachstetter, A. D. (2019). A Systematic Review of Closed Head Injury Models of Mild Traumatic Brain Injury in Mice and Rats. *J Neurotrauma*, 36(11), 1683-1706. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.6127>
- Bonder, D. E., Keating, C. E., Chandra, N., Cullen, D. K., & Pfister, B. J. (2018). Modeling Traumatic Brain Injury In Vitro. Dans A. K. Srivastava & C. S. Cox (édit.), *Pre-Clinical and Clinical Methods in Brain Trauma Research* (p. 37-69). Springer New York.
- Bouferguène, S., Lapierre, A., Houzé, B., Rainville, P., & Arbour, C. (2019). Chronic Central Pain Among Community-Dwelling Survivors of Moderate-to-Severe Traumatic Brain Injury: A Quantitative Sensory Testing Study. *Biol Res Nurs*, 21(5), 519-531. <https://doi.org/10.1177/1099800419859078>
- Bouley, J., Chung, D. Y., Ayata, C., Brown, R. H., Jr., & Henninger, N. (2019). Cortical Spreading Depression Denotes Concussion Injury. *J Neurotrauma*, 36(7), 1008-1017. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.5844>

- Bouzat, P., & Payen, J.-F. (2019). Therapeutic hypothermia after traumatic brain injury: Wrong hypotheses may lead to specious interpretations. *Anaesthesia Critical Care & Pain Medicine*, 38(2), 95-96. <https://doi.org/10.1016/j.accpm.2019.01.008>
- Bouzat, P., Sala, N., Payen, J.-F., & Oddo, M. (2013). Beyond intracranial pressure: optimization of cerebral blood flow, oxygen, and substrate delivery after traumatic brain injury. *Annals of Intensive Care*, 3(1), 23. <https://doi.org/10.1186/2110-5820-3-23>
- Box, G. E. P., & Cox, D. R. (1964). An Analysis of Transformations. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 26(2), 211-252. <http://www.jstor.org/stable/2984418>
- Brady, S. (2005). *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. Elsevier.
- Bramlett, H. M., & Dietrich, W. D. (2001). Neuropathological protection after traumatic brain injury in intact female rats versus males or ovariectomized females. *J Neurotrauma*, 18(9), 891-900. <https://doi.org/10.1089/089771501750451811>
- Brazinova, A., Rehorcikova, V., Taylor, M. S., Buckova, V., Majdan, M., Psota, M., . . . Synnot, A. (2018). Epidemiology of Traumatic Brain Injury in Europe: A Living Systematic Review. *J Neurotrauma*. <https://doi.org/10.1089/neu.2015.4126>
- Bryant, R. A., Marosszeky, J. E., Crooks, J., & Gurka, J. A. (2000). Posttraumatic stress disorder after severe traumatic brain injury. *Am J Psychiatry*, 157(4), 629-631. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.157.4.629>
- Bryden, D. W., Tilghman, J. I., & Hinds, S. R. (2019). Blast-Related Traumatic Brain Injury: Current Concepts and Research Considerations. *Journal of Experimental Neuroscience*, 13, 117906951987221. <https://doi.org/10.1177/1179069519872213>
- Bücheler, F., Morawska, M. M., Schreglmann, S. R., Penner, M., Muser, M., Baumann, C. R., & Noain, D. (2016). Novel Rat Model of Weight Drop-Induced Closed Diffuse Traumatic Brain Injury Compatible with Electrophysiological Recordings of Vigilance States. *J Neurotrauma*, 33(13), 1171-1180. <https://doi.org/10.1089/neu.2015.4001>
- Burda, J. E., Bernstein, A. M., & Sofroniew, M. V. (2016). Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Experimental Neurology*, 275, 305-315. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.03.020>
- Burkholder, T., Foltz, C., Karlsson, E., Linton, C. G., & Smith, J. M. (2012). Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice. *Current Protocols in Mouse Biology*, 2(2), 145-165. <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo110217>
- Burnett, D. M., Watanabe, T. K., & Greenwald, B. D. (2003). Congenital and acquired brain injury. 2. Brain injury rehabilitation: medical management. *Arch Phys Med Rehabil*, 84(3 Suppl 1), S8-11. <https://doi.org/10.1053/apmr.2003.50046>
- Carbonell, W. S., Maris, D. O., McCall, T., & Grady, M. S. (1998). Adaptation of the fluid percussion injury model to the mouse. *Journal of neurotrauma*, 15(3), 217-229.
- Caulfield, E. V., Dutton, R. P., Floccare, D. J., Stansbury, L. G., & Scalea, T. M. (2009). Prehospital hypocapnia and poor outcome after severe traumatic brain injury. *J Trauma*, 66(6), 1577-1582; discussion 1583. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e3181a3931d>
- Cederberg, D., & Siesjö, P. (2009). What has inflammation to do with traumatic brain injury? *Child's Nervous System*, 26(2), 221. <https://doi.org/10.1007/s00381-009-1029-x>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2019). *Prevention*. <https://www.cdc.gov/traumaticbraininjury/prevention.html>
- Cernak, I. (2005). Animal models of head trauma. *NeuroRX*, 2(3), 410-422. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.3.410>
- Cernak, I., Wing, I. D., Davidsson, J., & Plantman, S. (2014). A Novel Mouse Model of Penetrating Brain Injury. *Frontiers in Neurology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fneur.2014.00209>
- Chamoun, R., Suki, D., Gopinath, S. P., Goodman, J. C., & Robertson, C. (2010). Role of extracellular glutamate measured by cerebral microdialysis in severe traumatic brain injury. *J Neurosurg*, 113(3), 564-570. <https://doi.org/10.3171/2009.12.Jns09689>
- Charles, S. (2006). Traces du mécanisme cartésien au XVIIIe siècle : le cas de l'animal-machine. *Lumen*, 25, 41-55. <https://doi.org/https://doi.org/10.7202/1012076ar>

- Chary, K., Nissi, M. J., Nykänen, O., Manninen, E., Rey, R. I., Shmueli, K., . . . Gröhn, O. (2021). Quantitative susceptibility mapping of the rat brain after traumatic brain injury. *NMR in Biomedicine*, 34(2), e4438. <https://doi.org/10.1002/nbm.4438>
- Chauvet, D., Sainte-Rose, C., & Boch, A. L. (2010). [The mystery of prehistoric trepanations: Is neurosurgery the world eldest profession?]. *Neurochirurgie*, 56(5), 420-425. <https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2010.07.019>
- Chen, A. Y., & Colantonio, A. (2011). Defining neurotrauma in administrative data using the International Classification of Diseases Tenth Revision. *Emerg Themes Epidemiol*, 8(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1742-7622-8-4>
- Chen, H., Wu, F., Yang, P., Shao, J., Chen, Q., & Zheng, R. (2019). A meta-analysis of the effects of therapeutic hypothermia in adult patients with traumatic brain injury. *Critical Care*, 23(1), 396. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2667-3>
- Chen, K.-H., Lee, C.-P., Yang, Y.-H., Yang, Y.-H., Chen, C.-M., Lu, M.-L., . . . Chen, V. C.-H. (2019). Incidence of hydrocephalus in traumatic brain injury: A nationwide population-based cohort study. *Medicine*, 98(42). https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2019/10180/Incidence_of_hydrocephalus_in_traumatic_brain.45.aspx
- Chen, Q., He, S., Hu, X.-L., Yu, J., Zhou, Y., Zheng, J., . . . Xiong, Z.-Q. (2007). Differential Roles of NR2A- and NR2B-Containing NMDA Receptors in Activity-Dependent Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene Regulation and Limbic Epileptogenesis. *The Journal of Neuroscience*, 27(3), 542. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3607-06.2007>
- Chen, Y. C., Smith, D. H., & Meaney, D. F. (2009). In-vitro approaches for studying blast-induced traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 26(6), 861-876. <https://doi.org/10.1089/neu.2008.0645>
- Chesnut, R. M., Marshall, L. F., Klauber, M. R., Blunt, B. A., Baldwin, N., Eisenberg, H. M., . . . Foulkes, M. A. (1993). The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. *The Journal of trauma*, 34(2), 216-222.
- Chiou, K. S., Carlson, R. A., Arnett, P. A., Cosentino, S. A., & Hillary, F. G. (2011). Metacognitive Monitoring in Moderate and Severe Traumatic Brain Injury. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 17(4), 720-731. <https://doi.org/10.1017/S1355617711000658>
- Chitturi, J., Li, Y., Santhakumar, V., & Kannurpatti, S. S. (2018). Early behavioral and metabolomic change after mild to moderate traumatic brain injury in the developing brain. *Neurochemistry International*, 120, 75-86. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.08.003>
- Choe, M. C. (2016). The Pathophysiology of Concussion. *Current Pain and Headache Reports*, 20(6), 42. <https://doi.org/10.1007/s11916-016-0573-9>
- Christensen, J., Pedersen, M. G., Pedersen, C. B., Sidenius, P., Olsen, J., & Vestergaard, M. (2009). Long-term risk of epilepsy after traumatic brain injury in children and young adults: a population-based cohort study. *The Lancet*, 373(9669), 1105-1110. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(09\)60214-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(09)60214-2)
- Cipolla, M. J. (2009). Control of cerebral blood flow. Dans *The cerebral circulation*. Morgan & Claypool Life Sciences.
- Clausen, F., Hillered, L., & Marklund, N. (2019). The Fluid Percussion Injury Rodent Model in Preclinical Research on Traumatic Brain Injury. Dans M. Risling & J. Davidsson (édit.), *Animal Models of Neurotrauma* (p. 3-18). Springer New York.
- Clough, R. W., Neese, S. L., Sherill, L. K., Tan, A. A., Duke, A., Roosevelt, R. W., . . . Smith, D. C. (2007). Cortical edema in moderate fluid percussion brain injury is attenuated by vagus nerve stimulation. *Neuroscience*, 147(2), 286-293. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.04.043>
- Cockerham, G. C., Goodrich, G. L., Weichel, E. D., Orcutt, J. C., Rizzo, J. F., Bower, K. S., & Schuchard, R. A. (2009). Eye and visual function in traumatic brain injury. *J Rehabil Res Dev*, 46(6), 811-818. <https://doi.org/10.1682/jrrd.2008.08.0109>

- Cole, J. T., Yarnell, A., Kean, W. S., Gold, E., Lewis, B., Ren, M., . . . Watson, W. D. (2010). Craniotomy: True Sham for Traumatic Brain Injury, or a Sham of a Sham? *Journal of Neurotrauma*, 28(3), 359-369. <https://doi.org/10.1089/neu.2010.1427>
- Coles, J. P., Fryer, T. D., Coleman, M. R., Smielewski, P., Gupta, A. K., Minhas, P. S., . . . Menon, D. K. (2007). Hyperventilation following head injury: effect on ischemic burden and cerebral oxidative metabolism. *Crit Care Med*, 35(2), 568-578. <https://doi.org/10.1097/01.Ccm.0000254066.37187.88>
- Coqueugniot, H., Dutour, O., Arensburg, B., Duday, H., Vandermeersch, B., & Tillier, A. M. (2014). Earliest cranio-encephalic trauma from the Levantine Middle Palaeolithic: 3D reappraisal of the Qafzeh 11 skull, consequences of pediatric brain damage on individual life condition and social care. *PLoS One*, 9(7), e102822. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102822>
- Corkin, S., Rosen, T. J., Sullivan, E. V., & Clegg, R. A. (1989). Penetrating head injury in young adulthood exacerbates cognitive decline in later years. *J Neurosci*, 9(11), 3876-3883. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.09-11-03876.1989>
- Corrigan, J. D., Selassie, A. W., & Orman, J. A. (2010). The epidemiology of traumatic brain injury. *J Head Trauma Rehabil*, 25(2), 72-80. <https://doi.org/10.1097/HTR.0b013e3181ccc8b4>
- Cosgrove, K. P., Mazure, C. M., & Staley, J. K. (2007). Evolving Knowledge of Sex Differences in Brain Structure, Function, and Chemistry. *Biological Psychiatry*, 62(8), 847-855. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.03.001>
- Cristofori, I., & Levin, H. S. (2015). Chapter 37 - Traumatic brain injury and cognition. Dans J. Grafman & A. M. Salazar (édit.), *Handbook of Clinical Neurology* (vol. 128, p. 579-611). Elsevier.
- Cunningham, A. S., Salvador, R., Coles, J. P., Chatfield, D. A., Bradley, P. G., Johnston, A. J., . . . Menon, D. K. (2005). Physiological thresholds for irreversible tissue damage in contusional regions following traumatic brain injury. *Brain*, 128(8), 1931-1942. <https://doi.org/10.1093/brain/awh536>
- D'Ambrosio, R. (2004). Post-traumatic epilepsy following fluid percussion injury in the rat. *Brain*, 127(2), 304-314. <https://doi.org/10.1093/brain/awh038>
- Dash, H. H., & Chavali, S. (2018). Management of traumatic brain injury patients. *Korean Journal of Anesthesiology*, 71(1), 12. <https://doi.org/10.4097/kjae.2018.71.1.12>
- Dastugue, J. (1959). Un orifice crânien préhistorique. *Bulletins et mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris*, 10(4), 357-363.
- Deb, S., Lyons, I., Koutzoukis, C., Ali, I., & McCarthy, G. (1999). Rate of psychiatric illness 1 year after traumatic brain injury. *Am J Psychiatry*, 156(3), 374-378. <https://doi.org/10.1176/ajp.156.3.374>
- Deitcher, Y., Sachar, Y., & Vakil, E. (2020). Effect of eye movement reactivation on visual memory among individuals with moderate-to-severe traumatic brain injury (TBI). *J Clin Exp Neuropsychol*, 42(2), 208-221. <https://doi.org/10.1080/13803395.2019.1704223>
- DeKosky, S. T., & Asken, B. M. (2017). Injury cascades in TBI-related neurodegeneration. *Brain Inj*, 31(9), 1177-1182. <https://doi.org/10.1080/02699052.2017.1312528>
- DeKosky, S. T., Blennow, K., Ikonovic, M. D., & Gandy, S. (2013). Acute and chronic traumatic encephalopathies: pathogenesis and biomarkers. *Nature Reviews Neurology*, 9(4), 192-200. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.36>
- Dewan, M. C., Rattani, A., Gupta, S., Baticulon, R. E., Hung, Y. C., Punchak, M., . . . Park, K. B. (2018). Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *J Neurosurg*, 1-18. <https://doi.org/10.3171/2017.10.JNS17352>
- DeWitt, D. S., & Prough, D. S. (2009). Blast-induced brain injury and posttraumatic hypotension and hypoxemia. *J Neurotrauma*, 26(6), 877-887. <https://doi.org/10.1089/neu.2007.0439>
- Dhandapani, S., Sarda, A. C., Kapoor, A., Salunke, P., Mathuriya, S. N., & Mukherjee, K. K. (2015). Validation of a New Clinico-Radiological Grading for Compound Head Injury: Implications on the Prognosis and the Need for Surgical Intervention. *World Neurosurgery*, 84(5), 1244-1250. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.wneu.2015.05.058>
- Ding, K., Gupta, P. K., & Diaz-Arrastia, R. (2016). *Frontiers in Neuroscience*

Epilepsy after Traumatic Brain Injury. Dans D. Laskowitz & G. Grant (édit.), *Translational Research in Traumatic Brain Injury*. CRC Press/Taylor and Francis Group

© 2016 by Taylor & Francis Group, LLC.

- Dixon, C. E., Clifton, G. L., Lighthall, J. W., Yaghai, A. A., & Hayes, R. L. (1991). A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods*, 39(3), 253-262. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(91\)90104-8](https://doi.org/10.1016/0165-0270(91)90104-8)
- Dixon, C. E., Lighthall, J. W., & Anderson, T. E. (1988). Physiologic, histopathologic, and cineradiographic characterization of a new fluid-percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurotrauma*, 5(2), 91-104. <https://doi.org/10.1089/neu.1988.5.91>
- Dixon, C. E., Lyeth, B. G., Povlishock, J. T., Findling, R. L., Hamm, R. J., Marmarou, A., . . . Hayes, R. L. (1987). A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurosurg*, 67(1), 110-119. <https://doi.org/10.3171/jns.1987.67.1.0110>
- Dixon, C. E., Lyeth, B. G., Povlishock, J. T., Findling, R. L., Hamm, R. J., Marmarou, A., . . . Hayes, R. L. (1987). A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *Journal of Neurosurgery*, 67(1), 110. <https://doi.org/10.3171/jns.1987.67.1.0110>
- Do, J. P., Defensor, E. B., Ichim, C. V., Lim, M. A., Mechanic, J. A., Rabe, M. D., & Schaevitz, L. R. (2020). Automated and Continuous Monitoring of Animal Welfare through Digital Alerting. *Comp Med*, 70(4), 313-327. <https://doi.org/10.30802/aalas-cm-19-000090>
- Dreier, J. P. (2011). The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat Med*, 17(4), 439-447. <https://doi.org/10.1038/nm.2333>
- Dreier, J. P., Fabricius, M., Ayata, C., Sakowitz, O. W., William Shuttleworth, C., Dohmen, C., . . . Hartings, J. A. (2016). Recording, analysis, and interpretation of spreading depolarizations in neurointensive care: Review and recommendations of the COSBID research group. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 37(5), 1595-1625. <https://doi.org/10.1177/0271678X16654496>
- Dreier, J. P., Reiffurth, C., Woitzik, J., Hartings, J. A., Drenckhahn, C., Windler, C., . . . Herreras, O. (2015). How Spreading Depolarization Can Be the Pathophysiological Correlate of Both Migraine Aura and Stroke. Dans J. Fandino, S. Marbacher, A.-R. Fathi, C. Muroi, & E. Keller (édit.), *Neurovascular Events After Subarachnoid Hemorrhage: Towards Experimental and Clinical Standardisation* (p. 137-140). Springer International Publishing.
- Drenckhahn, C., Winkler, M. K. L., Major, S., Scheel, M., Kang, E.-J., Pinczolics, A., . . . for the, C. s. g. (2012). Correlates of spreading depolarization in human scalp electroencephalography. *Brain*, 135(3), 853-868. <https://doi.org/10.1093/brain/aws010>
- Duclos, C., Dumont, M., Wiseman-Hakes, C., Arbour, C., Mongrain, V., Gaudreault, P. O., . . . Gosselin, N. (2014). Sleep and wake disturbances following traumatic brain injury. *Pathologie Biologie*, 62(5), 252-261. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2014.05.014>
- Dumont, T. M., Visioni, A. J., Rughani, A. I., Tranmer, B. I., & Crookes, B. (2010). Inappropriate Prehospital Ventilation in Severe Traumatic Brain Injury Increases In-Hospital Mortality. *Journal of Neurotrauma*, 27(7), 1233-1241. <https://doi.org/10.1089/neu.2009.1216>
- Eakin, K., Rowe, R. K., & Lifshitz, J. (2015). Modeling Fluid Percussion Injury. *Brain neurotrauma: molecular, neuropsychological, and rehabilitation aspects*.
- Eakin, K., Rowe, R. K., & Lifshitz, J. (2015). Modeling Fluid Percussion Injury: Relevance to Human Traumatic Brain Injury. Dans F. H. Kobeissy (édit.), *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects*.
- Ellis, E. F., McKinney, J. S., Willoughby, K. A., Liang, S., & Povlishock, J. T. (1995). A new model for rapid stretch-induced injury of cells in culture: characterization of the model using astrocytes. *J Neurotrauma*, 12(3), 325-339. <https://doi.org/10.1089/neu.1995.12.325>
- Emerson, C. S., & Vink, R. (1992). Increased mortality in female rats after brain trauma is associated with lower free Mg²⁺. *Neuroreport*, 3(11), 957-960. <https://doi.org/10.1097/00001756-199211000-00002>

- Engberg, A. W., & Teasdale, T. W. (2004). Psychosocial outcome following traumatic brain injury in adults: a long-term population-based follow-up. *Brain Inj*, *18*(6), 533-545. <https://doi.org/10.1080/02699050310001645829>
- Fangyi, Z., Shane, M. S., Farrokh, F., Matthew, N. H., Minnette, G. S., & Dennis, G. V. (2002). Reversal of attenuation of cerebrovascular reactivity to hypercapnia by a nitric oxide donor after controlled cortical impact in a rat model of traumatic brain injury. *Journal of Neurosurgery*, *97*(4), 963-969. <https://doi.org/10.3171/jns.2002.97.4.0963>
- Farbota, K. D. M., Sodhi, A., Bendlin, B. B., McLaren, D. G., Xu, G., Rowley, H. A., & Johnson, S. C. (2012). Longitudinal Volumetric Changes following Traumatic Brain Injury: A Tensor-Based Morphometry Study. *Journal of the International Neuropsychological Society*, *18*(6), 1006-1018. <https://doi.org/10.1017/s1355617712000835>
- Faul, M., & Coronado, V. (2015). Epidemiology of traumatic brain injury. *Handb Clin Neurol*, *127*, 3-13. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-52892-6.00001-5>
- Fay, T. (1943). Observation on generalized refrigeration in cases of severe cerebral trauma. *Assoc Res Nerv Dis Proc*, *24*, 611-619.
- Feeney, D. M., Boyeson, M. G., Linn, R. T., Murray, H. M., & Dail, W. G. (1981). Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res*, *211*(1), 67-77. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90067-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90067-6)
- Fenn, N. E., 3rd, & Sierra, C. M. (2019). Hyperosmolar Therapy for Severe Traumatic Brain Injury in Pediatrics: A Review of the Literature. *J Pediatr Pharmacol Ther*, *24*(6), 465-472. <https://doi.org/10.5863/1551-6776-24.6.465>
- Ferguson, P. L., Smith, G. M., Wannamaker, B. B., Thurman, D. J., Pickelsimer, E. E., & Selassie, A. W. (2010). A population-based study of risk of epilepsy after hospitalization for traumatic brain injury. *Epilepsia*, *51*(5), 891-898. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02384.x>
- Feustel, S. M., Meissner, M., & Liesenfeld, O. (2012). Toxoplasma gondii and the blood-brain barrier. *Virulence*, *3*(2), 182-192. <https://doi.org/10.4161/viru.19004>
- Flierl, M. A., Stahel, P. F., Beauchamp, K. M., Morgan, S. J., Smith, W. R., & Shohami, E. (2009). Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. *Nature Protocols*, *4*(9), 1328-1337. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.148>
- Flores, D., Delouche, S., & Hotz, G. (2019). Preventing the Brain From Being Injured. *Frontiers for Young Minds*, *7*. <https://doi.org/10.3389/frym.2019.00018>
- Flower, O., & Hellings, S. (2012). Sedation in Traumatic Brain Injury. *Emergency Medicine International*, *2012*, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2012/637171>
- Floyd, C. L., Golden, K. M., Black, R. T., Hamm, R. J., & Lyeth, B. G. (2002). Craniectomy position affects morris water maze performance and hippocampal cell loss after parasagittal fluid percussion. *J Neurotrauma*, *19*(3), 303-316. <https://doi.org/10.1089/089771502753594873>
- Fordington, S., & Manford, M. (2020). A review of seizures and epilepsy following traumatic brain injury. *Journal of Neurology*. <https://doi.org/10.1007/s00415-020-09926-w>
- Forslund, M. V., Perrin, P. B., Røe, C., Sigurdardottir, S., Hellstrøm, T., Berntsen, S. A., . . . Andelic, N. (2019). Global Outcome Trajectories up to 10 Years After Moderate to Severe Traumatic Brain Injury. *Frontiers in Neurology*, *10*, 219. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2019.00219>
- Fortin, A., Lefebvre, M. B., & Ptito, M. (2010). Traumatic brain injury and olfactory deficits: The tale of two smell tests! *Brain Injury*, *24*(1), 27-33. <https://doi.org/10.3109/02699050903446815>
- Frati, A., Cerretani, D., Fiaschi, A. I., Frati, P., Gatto, V., La Russa, R., . . . Fineschi, V. (2017). Diffuse Axonal Injury and Oxidative Stress: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(12). <https://doi.org/10.3390/ijms18122600>
- Frey, L. C., Hellier, J., Unkart, C., Lepkin, A., Howard, A., Hasebroock, K., . . . Staley, K. (2009). A novel apparatus for lateral fluid percussion injury in the rat. *Journal of neuroscience methods*, *177*(2), 267-272. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.10.022>
- Galanaud, D., Perlberg, V., Gupta, R., Stevens, Robert D., Sanchez, P., Tollard, E., . . . Consortium, R. (2012). Assessment of White Matter Injury and Outcome in Severe Brain Trauma: A

- Prospective Multicenter Cohort. *Anesthesiology*, 117(6), 1300-1310. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3182755558>
- Ganz, J. (2015). Hippocrates, Celsus and Galen: Head Injury, the Brain, and the Bone. *Immunotechnology*, 2.
- Garthe, A., & Kempermann, G. (2013). An old test for new neurons: refining the Morris water maze to study the functional relevance of adult hippocampal neurogenesis. *Frontiers in Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00063>
- Geeraerts, T., & Menon, D. K. (2010). [Does intracranial pressure monitoring improve outcome after severe traumatic brain injury?]. *Ann Fr Anesth Reanim*, 29(9), e171-175. <https://doi.org/10.1016/j.annfar.2010.06.006>
- Goes, T. C., Antunes, F. D., & Teixeira-Silva, F. (2009). Trait and state anxiety in animal models: Is there correlation? *Neurosci Lett*, 450(3), 266-269. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.11.037>
- Gold, E. M., Su, D., López-Velázquez, L., Haus, D. L., Perez, H., Lacuesta, G. A., . . . Cummings, B. J. (2013). Functional assessment of long-term deficits in rodent models of traumatic brain injury. *Regenerative Medicine*, 8(4), 483-516. <https://doi.org/10.2217/rme.13.41>
- Graham, N., Jolly, A., Zimmerman, K., Bourke, N. J., Scott, G., Cole, J. H., . . . Sharp, D. J. (2020). Diffuse axonal injury predicts neurodegeneration after moderate–severe traumatic brain injury. *Brain*, 143(12), 3685-3698. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa316>
- Graham, N. S., & Sharp, D. J. (2019). Understanding neurodegeneration after traumatic brain injury: from mechanisms to clinical trials in dementia. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 90(11), 1221-1233. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-317557>
- Green, R. E. A., Colella, B., Maller, J. J., Bayley, M., Glazer, J., & Mikulis, D. J. (2014). Scale and pattern of atrophy in the chronic stages of moderate-severe TBI. *Frontiers in Human Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2014.00067>
- Gritti, P., Zangari, R., Carobbio, A., Zucchi, A., Lorini, F. L., Ferri, F., . . . Biroli, F. (2019). Acute and Subacute Outcome Predictors in Moderate and Severe Traumatic Brain Injury: A Retrospective Monocentric Study. *World Neurosurgery*, 128, e531-e540. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.04.190>
- Guerriero, R. M., Giza, C. C., & Rotenberg, A. (2015). Glutamate and GABA imbalance following traumatic brain injury. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 15(5), 27. <https://doi.org/10.1007/s11910-015-0545-1>
- Gupta, P. K., Sayed, N., Ding, K., Agostini, M. A., Van Ness, P. C., Yablon, S., . . . Diaz-Arrastia, R. (2014). Subtypes of post-traumatic epilepsy: clinical, electrophysiological, and imaging features. *J Neurotrauma*, 31(16), 1439-1443. <https://doi.org/10.1089/neu.2013.3221>
- Gupte, R., Brooks, W., Vukas, R., Pierce, J., & Harris, J. (2019). Sex Differences in Traumatic Brain Injury: What We Know and What We Should Know. *J Neurotrauma*, 36(22), 3063-3091. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.6171>
- Haddon Jr, W., & Baker, S. P. (1981). *Injury control*.
- Halbauer, J. D., Ashford, J. W., Zeitzer, J. M., Adamson, M. M., Lew, H. L., & Yesavage, J. A. (2009). Neuropsychiatric diagnosis and management of chronic sequelae of war-related mild to moderate traumatic brain injury. *J Rehabil Res Dev*, 46(6), 757-796. <https://doi.org/10.1682/jrrd.2008.08.0119>
- Hamm, R. J., Pike, B. R., O'Dell, D. M., Lyeth, B. G., & Jenkins, L. W. (1994). The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 11(2), 187-196. <https://doi.org/10.1089/neu.1994.11.187>
- Harary, M., Dolmans, R., & Gormley, W. (2018). Intracranial Pressure Monitoring—Review and Avenues for Development. *Sensors*, 18, 465. <https://doi.org/10.3390/s18020465>
- Harhangi, B. S., Kompanje, E. J., Leebeek, F. W., & Maas, A. I. (2008). Coagulation disorders after traumatic brain injury. *Acta Neurochir (Wien)*, 150(2), 165-175; discussion 175. <https://doi.org/10.1007/s00701-007-1475-8>
- Harlow, J. M. (1999). Passage of an iron rod through the head. 1848. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 11(2), 281-283. <https://doi.org/10.1176/jnp.11.2.281>

- Hartings, J. A., Bullock, M. R., Okonkwo, D. O., Murray, L. S., Murray, G. D., Fabricius, M., . . . Strong, A. J. (2011). Spreading depolarisations and outcome after traumatic brain injury: a prospective observational study. *The Lancet Neurology*, 10(12), 1058-1064. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70243-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70243-5)
- Hartings, J. A., Shuttleworth, C. W., Kirov, S. A., Ayata, C., Hinzman, J. M., Foreman, B., . . . Dreier, J. P. (2016). The continuum of spreading depolarizations in acute cortical lesion development: Examining Leão's legacy. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 37(5), 1571-1594. <https://doi.org/10.1177/0271678X16654495>
- Hausser, N., Johnson, K., Parsley, M. A., Guptarak, J., Spratt, H., & Sell, S. L. (2018). Detecting Behavioral Deficits in Rats After Traumatic Brain Injury. *J Vis Exp*(131). <https://doi.org/10.3791/56044>
- Hayward, N., Immonen, R., Tuunanen, P., Nnode-Ekane, X., Gröhn, O., & Pitkänen, A. (2010). Association of Chronic Vascular Changes with Functional Outcome after Traumatic Brain Injury in Rats. *Journal of neurotrauma*, 27, 2203-2219. <https://doi.org/10.1089/neu.2010.1448>
- Healy, E. T., Walter, K. H., & Chard, K. M. (2014). Effectiveness of Cognitive Processing Therapy for PTSD Across Various Populations, Traumatic Events, and Co-occurring Conditions. Dans C. R. Martin, V. R. Preedy, & V. B. Patel (édit.), *Comprehensive Guide to Post-Traumatic Stress Disorder* (p. 1-15). Springer International Publishing.
- Helbok, R., Meyfroidt, G., & Beer, R. (2018). Intracranial pressure thresholds in severe traumatic brain injury: Con. *Intensive Care Medicine*, 44(8), 1318-1320. <https://doi.org/10.1007/s00134-018-5249-y>
- Hermanides, J., Plummer, M. P., Finnis, M., Deane, A. M., Coles, J. P., & Menon, D. K. (2018). Glycaemic control targets after traumatic brain injury: a systematic review and meta-analysis. *Critical Care*, 22(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1883-y>
- Hickman, D. L., & Swan, M. (2010). Use of a body condition score technique to assess health status in a rat model of polycystic kidney disease. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 49(2), 155-159. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20353688>
- Hill, C. S., Coleman, M. P., & Menon, D. K. (2016). Traumatic Axonal Injury: Mechanisms and Translational Opportunities. *Trends in Neurosciences*, 39(5), 311-324. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.03.002>
- Holland, M. C., Mackersie, R. C., Morabito, D., Campbell, A. R., Kivett, V. A., Patel, R., . . . Pittet, J. F. (2003). The development of acute lung injury is associated with worse neurologic outcome in patients with severe traumatic brain injury. *J Trauma*, 55(1), 106-111. <https://doi.org/10.1097/01.Ta.0000071620.27375.Be>
- Holmes, J. F., Palchak, M. J., MacFarlane, T., & Kuppermann, N. (2005). Performance of the pediatric glasgow coma scale in children with blunt head trauma. *Acad Emerg Med*, 12(9), 814-819. <https://doi.org/10.1197/j.aem.2005.04.019>
- Hon, K. L., Leung, A. K. C., & Torres, A. R. (2019). Concussion: A Global Perspective. *Seminars in Pediatric Neurology*, 30, 117-127. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2019.03.017>
- Howell, J., Costanzo, R. M., & Reiter, E. R. (2018). Head trauma and olfactory function. *World Journal of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery*, 4(1), 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.wjorl.2018.02.001>
- Huck, J., Wanner, Y., Fan, A. P., Jäger, A.-T., Grahl, S., Schneider, U., . . . Gauthier, C. J. (2019). High resolution atlas of the venous brain vasculature from 7 T quantitative susceptibility maps. *bioRxiv*, 444349. <https://doi.org/10.1101/444349>
- Hughes, P. C., Tanner, J. M., & Williams, J. P. (1978). A longitudinal radiographic study of the growth of the rat skull. *Journal of anatomy*, 127(Pt 1), 83-91. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/701198>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1235645/>
- Humble, S. S., Wilson, L. D., Wang, L., Long, D. A., Smith, M. A., Siktberg, J. C., . . . Patel, M. B. (2018). Prognosis of diffuse axonal injury with traumatic brain injury. *J Trauma Acute Care Surg*, 85(1), 155-159. <https://doi.org/10.1097/ta.0000000000001852>

- Immonen, R. J., Kharatishvili, I., Gröhn, H., Pitkänen, A., & Gröhn, O. H. J. (2009). Quantitative MRI predicts long-term structural and functional outcome after experimental traumatic brain injury. *NeuroImage*, 45(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.11.022>
- Irvine, K.-A., & Clark, J. D. (2018). Chronic Pain After Traumatic Brain Injury: Pathophysiology and Pain Mechanisms. *Pain Medicine*, 19(7), 1315-1333. <https://doi.org/10.1093/pm/pnx153>
- Iwamoto, Y., Yamaki, T., Murakami, N., Umeda, M., Tanaka, C., Higuchi, T., . . . Ueda, S. (1997). Investigation of morphological change of lateral and midline fluid percussion injury in rats, using magnetic resonance imaging. *Neurosurgery*, 40(1), 163-167. <https://doi.org/10.1097/00006123-199701000-00036>
- James, S. L., Theadom, A., Ellenbogen, R. G., Bannick, M. S., Montjoy-Venning, W., Lucchesi, L. R., . . . Murray, C. J. L. (2019). Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, 18(1), 56-87. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30415-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30415-0)
- Jarrahi, A., Braun, M., Ahluwalia, M., Gupta, R. V., Wilson, M., Munie, S., . . . Vaibhav, K. (2020). Revisiting Traumatic Brain Injury: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Interventions. *Biomedicines*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/biomedicines8100389>
- Jarrard, L. E., Davidson, T. L., & Bowring, B. (2004). Functional differentiation within the medial temporal lobe in the rat. *Hippocampus*, 14(4), 434-449. <https://doi.org/10.1002/hipo.10194>
- Jennett, W. B. (1970). Secondary ischaemic brain damage after head injury. *Journal of Clinical Pathology*, s3-4(1), 172-175. <https://doi.org/10.1136/jcp.s3-4.1.172>
- Jha, R. M., Kochanek, P. M., & Simard, J. M. (2019). Pathophysiology and treatment of cerebral edema in traumatic brain injury. *Neuropharmacology*, 145, 230-246. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.08.004>
- Jiang, J.-Y., Gao, G.-Y., Li, W.-P., Yu, M.-K., & Zhu, C. (2002). Early Indicators of Prognosis in 846 Cases of Severe Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*, 19(7), 869-874. <https://doi.org/10.1089/08977150260190456>
- Jochems, D., van Wessem, K. J. P., Houwert, R. M., Brouwers, H. B., Dankbaar, J. W., van Es, M. A., . . . Leenen, L. P. H. (2018). Outcome in Patients with Isolated Moderate to Severe Traumatic Brain Injury. *Critical Care Research and Practice*, 2018, 3769418. <https://doi.org/10.1155/2018/3769418>
- Jones, N., Cardamone, L., Williams, J., Salzberg, M., Myers, D., & O'Brien, T. (2008). Experimental Traumatic Brain Injury Induces a Pervasive Hyperanxious Phenotype in Rats. *Journal of neurotrauma*, 25, 1367-1374. <https://doi.org/10.1089/neu.2008.0641>
- Jou, I. M., Tsai, Y.-T., Tsai, C.-L., Wu, M.-H., Chang, H.-Y., & Wang, N.-S. (2000). Simplified rat intubation using a new oropharyngeal intubation wedge. *Journal of Applied Physiology*, 89(5), 1766-1770. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.5.1766>
- Jourdan, C., Bayen, E., Bosserelle, V., Azerad, S., Genet, F., Fermanian, C., . . . Azouvi, P. (2013). Referral to Rehabilitation After Severe Traumatic Brain Injury. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 27(1), 35-44. <https://doi.org/10.1177/1545968312440744>
- Jullienne, A., Obenaus, A., Ichkova, A., Savona-Baron, C., Pearce, W. J., & Badaut, J. (2016). Chronic cerebrovascular dysfunction after traumatic brain injury. *Journal of neuroscience research*, 94(7), 609-622. <https://doi.org/10.1002/jnr.23732>
- Kabadi, S. V., & Byrnes, K. R. (2020). Assessment of Behavioral Dysfunction Following Experimental Traumatic Brain Injury (TBI). Dans (p. 315-349). Springer US.
- Kabadi, S. V., Hilton, G. D., Stoica, B. A., Zapple, D. N., & Faden, A. I. (2010). Fluid-percussion–induced traumatic brain injury model in rats. *Nature Protocols*, 5(9), 1552-1563. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.112>
- Kalish, B. T., & Whalen, M. J. (2016). Weight Drop Models in Traumatic Brain Injury. Dans (p. 193-209). Springer New York.

- Kammersgaard, L. P., Linnemann, M., & Tibæk, M. (2013). Hydrocephalus following severe traumatic brain injury in adults. Incidence, timing, and clinical predictors during rehabilitation. *NeuroRehabilitation*, 33, 473-480. <https://doi.org/10.3233/NRE-130980>
- Kamp, M. A., Tahsim-Oglou, Y., Steiger, H. J., & Hänggi, D. (2012). Traumatic brain injuries in the ancient Egypt: insights from the Edwin Smith Papyrus. *J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg*, 73(4), 230-237. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1313635>
- Kant, R., Duffy, J. D., & Pivovarnik, A. (1998). Prevalence of apathy following head injury. *Brain Inj*, 12(1), 87-92. <https://doi.org/10.1080/026990598122908>
- Kaur, P., & Sharma, S. (2018). Recent Advances in Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. *Curr Neuropharmacol*, 16(8), 1224-1238. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170613083606>
- Keith, K. A., & Huang, J. H. (2019). Animal Models of Post-Traumatic Epilepsy. *Diagnostics*, 10(1), 4. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10010004>
- Kharatishvili, I., Nissinen, J. P., McIntosh, T. K., & Pitkänen, A. (2006). A model of posttraumatic epilepsy induced by lateral fluid-percussion brain injury in rats. *Neuroscience*, 140(2), 685-697. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.03.012>
- Kim, S. H., Manes, F., Kosier, T., Baruah, S., & Robinson, R. G. (1999). Irritability Following Traumatic Brain Injury. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, 187(6). https://journals.lww.com/ionmd/Fulltext/1999/06000/Irritability_Following_Traumatic_Brain_Injury.1.aspx
- Kim, W.-S., Lee, K., Kim, S., Cho, S., & Paik, N.-J. (2019). Transcranial direct current stimulation for the treatment of motor impairment following traumatic brain injury. *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12984-019-0489-9>
- Kinnunen, K. M., Greenwood, R., Powell, J. H., Leech, R., Hawkins, P. C., Bonnelle, V., . . . Sharp, D. J. (2011). White matter damage and cognitive impairment after traumatic brain injury. *Brain*, 134(2), 449-463. <https://doi.org/10.1093/brain/awq347>
- Kinoshita, K., Chatzipanteli, K., Vitarbo, E., Truettner, J. S., Alonso, O. F., & Dietrich, W. D. (2002). Interleukin-1 β Messenger Ribonucleic Acid and Protein Levels after Fluid-Percussion Brain Injury in Rats: Importance of Injury Severity and Brain Temperature. *Neurosurgery*, 51(1), 195-203. <https://doi.org/10.1097/00006123-200207000-00027>
- Knoll, R. M., Lubner, R. J., Brodsky, J. R., Wong, K., Jung, D. H., Remenschneider, A. K., . . . Kozin, E. D. (2020). Auditory Quality-of-Life Measures in Patients With Traumatic Brain Injury and Normal Pure Tone Audiometry. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 163(6), 1250-1254. <https://doi.org/10.1177/0194599820933886>
- Ko, S.-B. (2013). Multimodality Monitoring in the Neurointensive Care Unit: A Special Perspective for Patients with Stroke. *Journal of Stroke*, 15(2), 99. <https://doi.org/10.5853/jos.2013.15.2.99>
- Kochanek, P. M., & Dixon, C. E. (2015). *Animal Models of Traumatic Brain Injury*. Neurosurgery. <https://clinicalgate.com/animal-models-of-traumatic-brain-injury/>
- Kolmodin, L., Sekhon, M. S., Henderson, W. R., Turgeon, A. F., & Griesdale, D. E. (2013). Hypernatremia in patients with severe traumatic brain injury: a systematic review. *Ann Intensive Care*, 3(1), 35. <https://doi.org/10.1186/2110-5820-3-35>
- Koo, T. K., & Li, M. Y. (2016). A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. *Journal of Chiropractic Medicine*, 15(2), 155-163. <https://doi.org/10.1016/j.icm.2016.02.012>
- Krueger, F., Pardini, M., Huey, E. D., Raymond, V., Solomon, J., Lipsky, R. H., . . . Grafman, J. (2011). The role of the Met66 brain-derived neurotrophic factor allele in the recovery of executive functioning after combat-related traumatic brain injury. *J Neurosci*, 31(2), 598-606. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1399-10.2011>
- Kshetry, V. R., Mindea, S. A., & Batjer, H. H. (2007). The management of cranial injuries in antiquity and beyond. *Neurosurg Focus*, 23(1), E8. <https://doi.org/10.3171/foc.2007.23.1.8>
- Ku, T. (2019). Management of traumatic brain injury in the intensive care unit: A useful mnemonic and a review of the literature. *Anesthesiology and Clinical Science Research*, 03(01). <https://doi.org/10.35841/anesthesiology.3.1.8-11>

- Kumaria, A. (2017). In Vitro Models as a Platform to Investigate Traumatic Brain Injury. *Alternatives to Laboratory Animals*, 45(4), 201-211. <https://doi.org/10.1177/026119291704500405>
- Kuo, J.-R., & Chio, C.-C. (2012). Brain temperature management in traumatic brain injury. *Formosan Journal of Surgery*, 45(6), 167-171. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fjs.2012.09.004>
- Kuo, J. R., Cheng, Y. H., Chen, Y. S., Chio, C. C., & Gean, P. W. (2013). Involvement of extracellular signal regulated kinases in traumatic brain injury-induced depression in rodents. *J Neurotrauma*, 30(14), 1223-1231. <https://doi.org/10.1089/neu.2012.2689>
- Kurland, D., Hong, C., Aarabi, B., Gerzanich, V., & Simard, J. M. (2012). Hemorrhagic progression of a contusion after traumatic brain injury: a review. *J Neurotrauma*, 29(1), 19-31. <https://doi.org/10.1089/neu.2011.2122>
- La Rosa, C., & Bonfanti, L. (2018). Brain Plasticity in Mammals: An Example for the Role of Comparative Medicine in the Neurosciences. *Frontiers in Veterinary Science*, 5(274). Perspective. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00274>
- Ladak, A. A., Enam, S. A., & Ibrahim, M. T. (2019). A Review of the Molecular Mechanisms of Traumatic Brain Injury. *World Neurosurgery*, 131, 126-132. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.07.039>
- Lapinlampi, N., Andrade, P., Paananen, T., Hämäläinen, E., Ekolle Ndode-Ekane, X., Puhakka, N., & Pitkänen, A. (2020). Postinjury weight rather than cognitive or behavioral impairment predicts development of posttraumatic epilepsy after lateral fluid-percussion injury in rats. *Epilepsia*, 61(9), 2035-2052. <https://doi.org/10.1111/epi.16632>
- Larson, M. D., & Behrends, M. (2015). Portable Infrared Pupillometry: A Review. *Anesthesia & Analgesia*, 120(6). https://journals.lww.com/anesthesia-analgesia/Fulltext/2015/06000/Portable_Infrared_Pupillometry_A_Review.14.aspx
- Lauritzen, M., Dreier, J. P., Fabricius, M., Hartings, J. A., Graf, R., & Strong, A. J. (2011). Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31(1), 17-35.
- Lazaridis, C., Rusin, C. G., & Robertson, C. S. (2019). Secondary brain injury: Predicting and preventing insults. *Neuropharmacology*, 145, 145-152. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.06.005>
- Leao, A. A. P. (1944). SPREADING DEPRESSION OF ACTIVITY IN THE CEREBRAL CORTEX. *Journal of Neurophysiology*, 7(6), 359-390. <https://doi.org/10.1152/jn.1944.7.6.359>
- Lelubre, C., Bouzat, P., Crippa, I. A., & Taccone, F. S. (2016). Anemia management after acute brain injury. *Critical Care*, 20(1), 152. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1321-6>
- Lew, H. L., Jerger, J. F., Guillory, S. B., & Henry, J. A. (2007). Auditory dysfunction in traumatic brain injury. *J Rehabil Res Dev*, 44(7), 921-928. <https://doi.org/10.1682/jrrd.2007.09.0140>
- Liu, Y. R., Cardamone, L., Hogan, R. E., Gregoire, M. C., Williams, J. P., Hicks, R. J., . . . Boullieret, V. (2010). Progressive Metabolic and Structural Cerebral Perturbations After Traumatic Brain Injury: An In Vivo Imaging Study in the Rat. *Journal of Nuclear Medicine*, 51(11), 1788-1795. <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.078626>
- Lobato, R. D., Cordobes, F., Rivas, J. J., de la Fuente, M., Montero, A., Barcena, A., . . . Lamas, E. (1983). Outcome from severe head injury related to the type of intracranial lesion. A computerized tomography study. *J Neurosurg*, 59(5), 762-774. <https://doi.org/10.3171/jns.1983.59.5.0762>
- Lu, X. Y., Sun, H., Li, Q. Y., & Lu, P. S. (2016). Progesterone for Traumatic Brain Injury: A Meta-Analysis Review of Randomized Controlled Trials. *World Neurosurg*, 90, 199-210. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2016.02.110>
- Lustenberger, T., Talving, P., Kobayashi, L., Inaba, K., Lam, L., Plurad, D., & Demetriades, D. (2010). Time course of coagulopathy in isolated severe traumatic brain injury. *Injury*, 41(9), 924-928. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2010.04.019>
- Lyeth, B. G. (2016). Historical Review of the Fluid-Percussion TBI Model. *Frontiers in Neurology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fneur.2016.00217>

- Ma, C., Wu, X., Shen, X., Yang, Y., Chen, Z., Sun, X., & Wang, Z. (2019). Sex differences in traumatic brain injury: a multi-dimensional exploration in genes, hormones, cells, individuals, and society. *Chin Neurosurg J*, 5, 24. <https://doi.org/10.1186/s41016-019-0173-8>
- Ma, J., Zhang, K., Wang, Z., & Chen, G. (2016). Progress of Research on Diffuse Axonal Injury after Traumatic Brain Injury. *Neural Plasticity*, 2016, 9746313. <https://doi.org/10.1155/2016/9746313>
- Ma, X., Aravind, A., Pfister, B. J., Chandra, N., & Haorah, J. (2019). Animal Models of Traumatic Brain Injury and Assessment of Injury Severity. *Molecular Neurobiology*, 56(8), 5332-5345. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1454-5>
- Maas, A., Hukkelhoven, C., Marshall, L., & Steyerberg, E. (2005). Prediction of outcome in traumatic brain injury with computed tomographic characteristics: a comparison between the computed tomographic classification and combinations of computed tomographic predictors. *Neurosurgery*, 57, 1173-1182.
- Maas, A. I. R., Menon, D. K., Adelson, P. D., Andelic, N., Bell, M. J., Belli, A., . . . Zumbo, F. (2017). Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *The Lancet Neurology*, 16(12), 987-1048. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30371-x](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30371-x)
- Maas, A. I. R., Stocchetti, N., & Bullock, R. (2008). Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *The Lancet Neurology*, 7(8), 728-741. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70164-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70164-9)
- Maegele, M., Lefering, R., Sakowitz, O., Kopp, M. A., Schwab, J. M., Steudel, W. I., . . . Marzi, I. (2019). The Incidence and Management of Moderate to Severe Head Injury. *Dtsch Arztebl Int*, 116(10), 167-173. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2019.0167>
- Majdan, M., Plancikova, D., Brazinova, A., Rusnak, M., Nieboer, D., Feigin, V., & Maas, A. (2016). Epidemiology of traumatic brain injuries in Europe: a cross-sectional analysis. *The Lancet Public Health*, 1(2), e76-e83. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(16\)30017-2](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(16)30017-2)
- Malkesman, O., Tucker, L., Ozi, J., & McCabe, J. (2013). Traumatic Brain Injury – Modeling Neuropsychiatric Symptoms in Rodents. *Frontiers in Neurology*, 4(157). Review. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00157>
- Mao, H., Lu, L., Bian, K., Clausen, F., Colgan, N., & Gilchrist, M. (2018). Biomechanical analysis of fluid percussion model of brain injury. *Journal of Biomechanics*, 77, 228-232. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2018.07.004>
- Marie-Robert, F. N. (2014). BIEN COMPRENDRE LES TRAUMATISMES CRÂNIENS. <https://www.fondationneurotrauma.ca/bien-comprendreles-traumatismes-craniens-1116/>
- Marklund, N. (2016). Rodent Models of Traumatic Brain Injury: Methods and Challenges. Dans (p. 29-46). Springer New York.
- Marmarou, A., Fatouros, P. P., Barzó, P., Portella, G., Yoshihara, M., Tsuji, O., . . . Young, H. F. (2000). Contribution of edema and cerebral blood volume to traumatic brain swelling in head-injured patients. *J Neurosurg*, 93(2), 183-193. <https://doi.org/10.3171/jns.2000.93.2.0183>
- Marmarou, A., Foda, M. A., van den Brink, W., Campbell, J., Kita, H., & Demetriadou, K. (1994). A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg*, 80(2), 291-300. <https://doi.org/10.3171/jns.1994.80.2.0291>
- Marshall, L. F., Marshall, S. B., Klauber, M. R., Clark, M. V. B., Eisenberg, H. M., Jane, J. A., . . . Foulkes, M. A. (1991). A new classification of head injury based on computerized tomography. *Journal of Neurosurgery*, 75(Supplement), S14-S20. <https://doi.org/10.3171/sup.1991.75.1s.0s14>
- Martini, R. P., Deem, S., & Treggiari, M. M. (2013). Targeting Brain Tissue Oxygenation in Traumatic Brain Injury. *Respiratory Care*, 58(1), 162-172. <https://doi.org/10.4187/respcare.01942>
- Martland, H. S. (1928). Punch drunk. *Journal of the American Medical Association*, 91(15), 1103-1107.
- Masel, B. E., & DeWitt, D. S. (2010). Traumatic brain injury: a disease process, not an event. *J Neurotrauma*, 27(8), 1529-1540. <https://doi.org/10.1089/neu.2010.1358>

- Masel, B. E., Scheibel, R. S., Kimbark, T., & Kuna, S. T. (2001). Excessive daytime sleepiness in adults with brain injuries. *Arch Phys Med Rehabil*, 82(11), 1526-1532. <https://doi.org/10.1053/apmr.2001.26093>
- Masson, F., Thicoipe, M., Aye, P., Mokni, T., Senjean, P., Schmitt, V., . . . Labadens, P. (2001). Epidemiology of severe brain injuries: a prospective population-based study. *J Trauma*, 51(3), 481-489. <https://doi.org/10.1097/00005373-200109000-00010>
- Mathias, J. L., & Alvaro, P. K. (2012). Prevalence of sleep disturbances, disorders, and problems following traumatic brain injury: A meta-analysis. *Sleep Medicine*, 13(7), 898-905. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sleep.2012.04.006>
- Matsushima, K., Peng, M., Velasco, C., Schaefer, E., Diaz-Arrastia, R., & Frankel, H. (2012). Glucose variability negatively impacts long-term functional outcome in patients with traumatic brain injury. *Journal of Critical Care*, 27(2), 125-131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2011.08.012>
- Maxwell, W. L., Povlishock, J. T., & Graham, D. L. (1997). A mechanistic analysis of nondisruptive axonal injury: a review. *Journal of neurotrauma*, 14(7), 419-440.
- McAllister, T. W. (2008). Neurobehavioral sequelae of traumatic brain injury: evaluation and management. *World Psychiatry*, 7(1), 3-10. <https://doi.org/10.1002/j.2051-5545.2008.tb00139.x>
- McIntosh, T. K., Vink, R., Noble, L., Yamakami, I., Fernyak, S., Soares, H., & Faden, A. L. (1989). Traumatic brain injury in the rat: Characterization of a lateral fluid-percussion model. *Neuroscience*, 28(1), 233-244. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90247-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90247-9)
- McKee, A. C., & Daneshvar, D. H. (2015). Chapter 4 - The neuropathology of traumatic brain injury. Dans J. Grafman & A. M. Salazar (édit.), *Handbook of Clinical Neurology* (vol. 127, p. 45-66). Elsevier.
- McNamara, E. H., Grillakis, A. A., Tucker, L. B., & McCabe, J. T. (2020). The closed-head impact model of engineered rotational acceleration (CHIMERA) as an application for traumatic brain injury pre-clinical research: A status report. *Experimental Neurology*, 333, 113409. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113409>
- McNamee, S., Walker, W., Cifu, D. X., & Wehman, P. H. (2009). Minimizing the effect of TBI-related physical sequelae on vocational return. *J Rehabil Res Dev*, 46(6), 893-908. <https://doi.org/10.1682/jrrd.2008.08.0106>
- McNett, M. M., Horowitz, D. A., & The Participants in the International Multidisciplinary Consensus Conference on Multimodality, M. (2014). International Multidisciplinary Consensus Conference on Multimodality Monitoring: ICU Processes of Care. *Neurocritical Care*, 21(2), 215-228. <https://doi.org/10.1007/s12028-014-0020-x>
- Meldrum, B. S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr*, 130(4S Suppl), 1007s-1015s. <https://doi.org/10.1093/jn/130.4.1007S>
- Mele, C., Pingue, V., Caputo, M., Zavattaro, M., Pagano, L., Prodám, F., . . . Marzullo, P. (2021). Neuroinflammation and Hypothalamo-Pituitary Dysfunction: Focus of Traumatic Brain Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2686. <https://doi.org/10.3390/ijms22052686>
- Meng, L., & Gelb, A. W. (2015). Regulation of cerebral autoregulation by carbon dioxide. *Anesthesiology*, 122(1), 196-205. <https://doi.org/10.1097/aln.0000000000000506>
- Menon, D. K., Schwab, K., Wright, D. W., Maas, A. I., Demographics, Clinical Assessment Working Group of the, I., . . . Psychological, H. (2010). Position statement: definition of traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil*, 91(11), 1637-1640. <https://doi.org/10.1016/j.apmr.2010.05.017>
- Mesfin, F. B., Gupta, N., Shapshak, A. H., & Taylor, R. S. (2020). Diffuse axonal injury (DAI). *StatPearls [Internet]*.
- Meythaler, J. M., Peduzzi, J. D., Eleftheriou, E., & Novack, T. A. (2001). Current concepts: Diffuse axonal injury-associated traumatic brain injury. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 82(10), 1461-1471. <https://doi.org/https://doi.org/10.1053/apmr.2001.25137>

- Mishra, V., Skotak, M., Schuetz, H., Heller, A., Haorah, J., & Chandra, N. (2016). Primary blast causes mild, moderate, severe and lethal TBI with increasing blast overpressures: Experimental rat injury model. *Scientific Reports*, 6(1), 26992. <https://doi.org/10.1038/srep26992>
- Moeller, K., Willmes, K., & Klein, E. (2015). A review on functional and structural brain connectivity in numerical cognition. *Frontiers in Human Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2015.00227>
- Moeschler, O., Boulard, G., & Ravussin, P. (1995). Concept d'agression cérébrale secondaire d'origine systémique (ACSOS). *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 14(1), 114-121. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0750-7658\(05\)80159-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0750-7658(05)80159-5)
- Mohamed, A. Z., Corrigan, F., Collins-Praino, L. E., Plummer, S. L., Soni, N., & Nasrallah, F. A. (2020). Evaluating spatiotemporal microstructural alterations following diffuse traumatic brain injury. *Neuroimage Clin*, 25, 102136. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2019.102136>
- Mokri, B. (2001). The Monro-Kellie hypothesis: applications in CSF volume depletion. *Neurology*, 56(12), 1746-1748. <https://doi.org/10.1212/wnl.56.12.1746>
- Mollayeva, T., Mollayeva, S., & Colantonio, A. (2018). Traumatic brain injury: sex, gender and intersecting vulnerabilities. *Nature Reviews Neurology*, 14(12), 711-722. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0091-y>
- Monson, K. L., Converse, M. I., & Manley, G. T. (2019). Cerebral blood vessel damage in traumatic brain injury. *Clinical Biomechanics*, 64, 98-113. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clinbiomech.2018.02.011>
- Montgomery, C. A., Jr. (1987). Control of animal pain and distress in cancer and toxicologic research. *J Am Vet Med Assoc*, 191(10), 1277-1281.
- Morales, D. M., Marklund, N., Lebold, D., Thompson, H. J., Pitkanen, A., Maxwell, W. L., . . . McIntosh, T. K. (2005). Experimental models of traumatic brain injury: Do we really need to build a better mousetrap? *Neuroscience*, 136(4), 971-989. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.08.030>
- Morrison, B., 3rd, Saatman, K. E., Meaney, D. F., & McIntosh, T. K. (1998). In vitro central nervous system models of mechanically induced trauma: a review. *J Neurotrauma*, 15(11), 911-928. <https://doi.org/10.1089/neu.1998.15.911>
- Morrison, B., Elkin, B. S., Dollé, J. P., & Yarmush, M. L. (2011). In Vitro Models of Traumatic Brain Injury. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 13(1), 91-126. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071910-124706>
- Morton, D. B. (2000). A systematic approach for establishing humane endpoints. *Ilar j*, 41(2), 80-86. <https://doi.org/10.1093/ilar.41.2.80>
- Morton, D. B., & Griffiths, P. H. (1985). Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec*, 116(16), 431-436. <https://doi.org/10.1136/vr.116.16.431>
- Mrozek, S., Srairi, M., & Geeraerts, T. (2017). Traumatisme crânien grave à la phase aiguë. *Anesthésie & Réanimation*, 3(1), 11-24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anrea.2016.12.007>
- Mukherjee, S., Arisi, G. M., Mims, K., Hollingsworth, G., O'Neil, K., & Shapiro, L. A. (2020). Neuroinflammatory mechanisms of post-traumatic epilepsy. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01854-w>
- Mukherjee, S., Zeitouni, S., Cavarsan, C. F., & Shapiro, L. A. (2013). Increased Seizure Susceptibility in Mice 30 Days after Fluid Percussion Injury. *Frontiers in Neurology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00028>
- Mullally, W. J. (2017). Concussion. *The American Journal of Medicine*, 130(8), 885-892. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2017.04.016>
- Munakomi, S. (2016). A comparative study between Marshall and Rotterdam CT scores in predicting early deaths in patients with traumatic brain injury in a major tertiary care hospital in Nepal. *Chinese Journal of Traumatology*, 19(1), 25-27. <https://doi.org/10.1016/j.cjtee.2015.12.005>
- Ndode-Ekane, X. E., Santana-Gomez, C., Casillas-Espinosa, P. M., Ali, I., Brady, R. D., Smith, G., . . . Pitkänen, A. (2019). Harmonization of lateral fluid-percussion injury model production and

- post-injury monitoring in a preclinical multicenter biomarker discovery study on post-traumatic epileptogenesis. *Epilepsy Research*, 151, 7-16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2019.01.006>
- Nemetz, P. N., Leibson, C., Naessens, J. M., Beard, M., Kokmen, E., Annegers, J. F., & Kurland, L. T. (1999). Traumatic brain injury and time to onset of Alzheimer's disease: a population-based study. *Am J Epidemiol*, 149(1), 32-40. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a009724>
- Newcombe, V. F., Outtrim, J. G., Chatfield, D. A., Manktelow, A., Hutchinson, P. J., Coles, J. P., . . . Menon, D. K. (2011). Parcellating the neuroanatomical basis of impaired decision-making in traumatic brain injury. *Brain*, 134(Pt 3), 759-768. <https://doi.org/10.1093/brain/awq388>
- Ng, S. Y., & Lee, A. Y. W. (2019). Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00528>
- Nguyen, R., Fiest, K. M., McChesney, J., Kwon, C.-S., Jette, N., Frolkis, A. D., . . . Gallagher, C. (2016). The International Incidence of Traumatic Brain Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques*, 43(6), 774-785. <https://doi.org/10.1017/cjn.2016.290>
- Norden, D. M., Muccigrosso, M. M., & Godbout, J. P. (2015). Microglial priming and enhanced reactivity to secondary insult in aging, and traumatic CNS injury, and neurodegenerative disease. *Neuropharmacology*, 96, 29-41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.10.028>
- Noterman, J. (2016). [Short history of cranial trauma in western country (part 1)]. *Rev Med Brux*, 37(6), 504-508. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28525182>
- O'Connor, W. T., Smyth, A., & Gilchrist, M. D. (2011). Animal models of traumatic brain injury: A critical evaluation. *Pharmacology & Therapeutics*, 130(2), 106-113. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.01.001>
- O'Neil, M. E., Carlson, K., Storzbach, D., Brenner, L., Freeman, M., Quiñones, A., . . . Kansagara, D. (2014). Complications of mild traumatic brain injury in veterans and military personnel: a systematic review.
- Obenaus, A. (2016). Traumatic Brain Injury. Dans H. S. Friedman (édit.), *Encyclopedia of Mental Health (Second Edition)* (p. 329-340). Academic Press.
- Oberholzer, M., & Müri, R. M. (2019). Neurorehabilitation of Traumatic Brain Injury (TBI): A Clinical Review. *Medical Sciences*, 7(3), 47. <https://doi.org/10.3390/medsci7030047>
- Oddo, M., Schmidt, J. M., Carrera, E., Badjatia, N., Connolly, E. S., Presciutti, M., . . . Mayer, S. A. (2008). Impact of tight glycemic control on cerebral glucose metabolism after severe brain injury: a microdialysis study. *Crit Care Med*, 36(12), 3233-3238. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31818f4026>
- Oleksiak, M., Smith, B. M., St Andre, J. R., Caughlan, C. M., & Steiner, M. (2012). Audiological issues and hearing loss among Veterans with mild traumatic brain injury. *J Rehabil Res Dev*, 49(7), 995-1004. <https://doi.org/10.1682/jrrd.2011.01.0001>
- Olesen, J., Gustavsson, A., Svensson, M., Wittchen, H. U., & Jönsson, B. (2012). The economic cost of brain disorders in Europe. *European Journal of Neurology*, 19(1), 155-162. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2011.03590.x>
- Ondek, K., Pevzner, A., Tercovich, K., Schedlbauer, A. M., Izadi, A., Ekstrom, A. D., . . . Gurkoff, G. G. (2020). Recovery of Theta Frequency Oscillations in Rats Following Lateral Fluid Percussion Corresponds With a Mild Cognitive Phenotype. *Frontiers in Neurology*, 11, 1500. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.600171>
- <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2020.600171>
- Orihuela, R., McPherson, C. A., & Harry, G. J. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *British Journal of Pharmacology*, 173(4), 649-665. <https://doi.org/10.1111/bph.13139>
- <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/bph.13139>
- Osier, N. D., Carlson, S. W., DeSana, A., & Dixon, C. E. (2015). Chronic Histopathological and Behavioral Outcomes of Experimental Traumatic Brain Injury in Adult Male Animals. *J Neurotrauma*, 32(23), 1861-1882. <https://doi.org/10.1089/neu.2014.3680>

- Ouellet, M. C., Beaulieu-Bonneau, S., & Morin, C. M. (2006). Insomnia in patients with traumatic brain injury: frequency, characteristics, and risk factors. *J Head Trauma Rehabil*, 21(3), 199-212. <https://doi.org/10.1097/00001199-200605000-00001>
- Ouyang, W., Yan, Q., Zhang, Y., & Fan, Z. (2017). Moderate injury in motor-sensory cortex causes behavioral deficits accompanied by electrophysiological changes in mice adulthood. *PLOS ONE*, 12(2), e0171976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171976>
- Pacheco, J. M., Hines-Lanham, A., Stratton, C., Mehos, C. J., McCurdy, K. E., Pinkowski, N. J., . . . Morton, R. A. (2019). Spreading Depolarizations Occur in Mild Traumatic Brain Injuries and Are Associated with Postinjury Behavior. *eneuro*, 6(6), ENEURO.0070-0019. <https://doi.org/10.1523/eneuro.0070-19.2019>
- Pais-Roldan, P., Edlow, B. L., Jiang, Y., Stelzer, J., Zou, M., & Yu, X. (2019). Multimodal assessment of recovery from coma in a rat model of diffuse brainstem tegmentum injury. *Neuroimage*, 189, 615-630. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.01.060>
- Pan, W., Stone, K. P., Hsuchou, H., Manda, V. K., Zhang, Y., & Kastin, A. J. (2011). Cytokine signaling modulates blood-brain barrier function. *Curr Pharm Des*, 17(33), 3729-3740. <https://doi.org/10.2174/138161211798220918>
- Panourias, I. G., Skiadas, P. K., Sakas, D. E., & Marketos, S. G. (2005). Hippocrates: a pioneer in the treatment of head injuries. *Neurosurgery*, 57(1), 181-189; discussion 181-189. <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000163416.66374.48>
- Paredes, M. F., Sorrells, S. F., Garcia-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (2016). Brain size and limits to adult neurogenesis. *J Comp Neurol*, 524(3), 646-664. <https://doi.org/10.1002/cne.23896>
- Parodi, A.-L. (2009). Éthique en expérimentation animale. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 193(8), 1737-1746. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)32407-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)32407-0)
- Pascual, J. M., & Prieto, R. (2012). Chapter 133 - Surgical Management of Severe Closed Head Injury in Adults. Dans A. Quiñones-Hinojosa (édit.), *Schmidek and Sweet Operative Neurosurgical Techniques (Sixth Edition)* (p. 1513-1538). W.B. Saunders.
- Peeters, W., van den Brande, R., Polinder, S., Brazinova, A., Steyerberg, E. W., Lingsma, H. F., & Maas, A. I. (2015). Epidemiology of traumatic brain injury in Europe. *Acta Neurochir (Wien)*, 157(10), 1683-1696. <https://doi.org/10.1007/s00701-015-2512-7>
- Pence, T. S., Reiter, E. R., DiNardo, L. J., & Costanzo, R. M. (2014). Risk factors for hazardous events in olfactory-impaired patients. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 140(10), 951-955. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2014.1675>
- Perel, P., Arango, M., Clayton, T., Edwards, P., Komolafe, E., Poccock, S., . . . Yutthakasemsunt, S. (2008). Predicting outcome after traumatic brain injury: practical prognostic models based on large cohort of international patients. *Bmj*, 336(7641), 425-429. <https://doi.org/10.1136/bmj.39461.643438.25>
- Perrein, A., Petry, L., Reis, A., Baumann, A., Mertes, P., & Audibert, G. (2015). Cerebral vasospasm after traumatic brain injury: an update. *Minerva Anesthesiol*, 81(11), 1219-1228.
- Pfenninger, E. G., Reith, A., Breitig, D., Grünert, A., & Ahnefeld, F. W. (1989). Early changes of intracranial pressure, perfusion pressure, and blood flow after acute head injury. Part 1: An experimental study of the underlying pathophysiology. *J Neurosurg*, 70(5), 774-779. <https://doi.org/10.3171/jns.1989.70.5.0774>
- Pierce, J. E. S., Smith, D. H., Trojanowski, J. Q., & McIntosh, T. K. (1998). Enduring cognitive, neurobehavioral and histopathological changes persist for up to one year following severe experimental brain injury in rats. *Neuroscience*, 87(2), 359-369. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(98\)00142-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(98)00142-0)
- Pietrobon, D., & Moskowitz, M. A. (2014). Chaos and commotion in the wake of cortical spreading depression and spreading depolarizations. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(6), 379-393. <https://doi.org/10.1038/nrn3770>
- Pinkernell, S., Becker, K., & Lindauer, U. (2016). Severity assessment and scoring for neurosurgical models in rodents. *Lab Anim*, 50(6), 442-452. <https://doi.org/10.1177/0023677216675010>

- Pitkänen, A., & Bolkvadze, T. (2010). Epileptogenesis After Traumatic Brain Injury. Dans C. P. Panayiotopoulos (édit.), *Atlas of Epilepsies* (p. 335-341). Springer London.
- Pitkänen, A., & Immonen, R. (2014). Epilepsy Related to Traumatic Brain Injury. *Neurotherapeutics*, 11(2), 286-296. <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0260-7>
- Pitt, J., Pitt, Y., & Lockwich, J. (2020). Chapter 44 - Clinical and cellular aspects of traumatic brain injury. Dans R. C. Gupta (édit.), *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents (Third Edition)* (p. 745-765). Academic Press.
- Plantman, S. (2015). Novel rodent models of penetrating traumatic brain injury. *Neural Regeneration Research*, 10(7), 1047-1049. Perspective. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.160074>
- Pop, V., & Badaut, J. (2011). A Neurovascular Perspective for Long-Term Changes After Brain Trauma. *Translational Stroke Research*, 2(4), 533-545. <https://doi.org/10.1007/s12975-011-0126-9>
- Prasetyo, E. (2020). The primary, secondary and, tertiary brain injury. *Crit Care Shock*, 23, 4-13.
- Price, D. J. E., & Murray, A. (1972). The influence of hypoxia and hypotension on recovery from head injury. *Injury*, 3(4), 218-224. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0020-1383\(72\)90104-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0020-1383(72)90104-0)
- Prins, M. L., Lee, S. M., Cheng, C. L. Y., Becker, D. P., & Hovda, D. A. (1996). Fluid percussion brain injury in the developing and adult rat: a comparative study of mortality, morphology, intracranial pressure and mean arterial blood pressure. *Developmental Brain Research*, 95(2), 272-282. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(96\)00098-3](https://doi.org/10.1016/0165-3806(96)00098-3)
- Qiu, W., Guo, C., Shen, H., Chen, K., Wen, L., Huang, H., . . . Wang, W. (2009). Effects of unilateral decompressive craniectomy on patients with unilateral acute post-traumatic brain swelling after severe traumatic brain injury. *Crit Care*, 13(6), R185. <https://doi.org/10.1186/cc8178>
- R Core Team. (2020). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/>
- Rabinowitz, A. R., & Levin, H. S. (2014). Cognitive sequelae of traumatic brain injury. *Psychiatr Clin North Am*, 37(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2013.11.004>
- Rabinowitz, A. R., & Levin, H. S. (2014). Cognitive Sequelae of Traumatic Brain Injury. *Psychiatric Clinics of North America*, 37(1), 1-11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psc.2013.11.004>
- Ramon y Cajal, S., Defelipe, J., Jones, E. G., & May, R. M. (2012). *Cajal's Degeneration and Regeneration of the Nervous System*.
- Rana, A., Singh, S., Sharma, R., & Kumar, A. (2019). Traumatic Brain Injury Altered Normal Brain Signaling Pathways: Implications for Novel Therapeutics Approaches. *Current Neuropharmacology*, 17(7), 614-629. <https://doi.org/10.2174/1570159x16666180911121847>
- Rao, V., Rosenberg, P., Bertrand, M., Salehinia, S., Spiro, J., Vaishnavi, S., . . . Miles, Q. S. (2009). Aggression after traumatic brain injury: prevalence and correlates. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 21(4), 420-429. <https://doi.org/10.1176/jnp.2009.21.4.420>
- Rau, T. F., Kothiwala, A. S., Rova, A. R., Brooks, D. M., & Poulsen, D. J. (2012). Treatment with low-dose methamphetamine improves behavioral and cognitive function after severe traumatic brain injury. *J Trauma Acute Care Surg*, 73(2 Suppl 1), S165-172. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e318260896a>
- Reid, A. Y., Bragin, A., Giza, C. C., Staba, R. J., & Engel Jr, J. (2016). The progression of electrophysiologic abnormalities during epileptogenesis after experimental traumatic brain injury. *Epilepsia*, 57(10), 1558-1567.
- Reiter, E. R., & Costanzo, R. M. (2012). Chemosensory Impairment after Traumatic Brain Injury: Assessment and Management. *Int Neurotrauma Lett*, 23, 3-.
- Reiter, E. R., DiNardo, L. J., & Costanzo, R. M. (2004). Effects of head injury on olfaction and taste. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 37(6), 1167-1184. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.otc.2004.06.005>
- Restrepo-Álvarez, C. A., Valderrama-Molina, C. O., Giraldo-Ramírez, N., Constain-Franco, A., Puerta, A., León, A. L., & Jaimes, F. (2016). Trauma severity scores. *Colombian Journal of Anesthesiology*, 44(4), 317-323. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rcae.2016.06.004>
- Riggio, S. (2011). Traumatic Brain Injury and Its Neurobehavioral Sequelae. *Neurologic Clinics*, 29(1), 35-47. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2010.10.008>

- Risling, M., & Davidsson, J. (2012). Experimental Animal Models for Studies on the Mechanisms of Blast-Induced Neurotrauma. *Frontiers in Neurology*, 3, 30. 10.3389/fneur.2012.00030. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2012.00030>
- Rodgers, K. M., Dudek, F. E., & Barth, D. S. (2015). Progressive, Seizure-Like, Spike-Wave Discharges Are Common in Both Injured and Uninjured Sprague-Dawley Rats: Implications for the Fluid Percussion Injury Model of Post-Traumatic Epilepsy. *J Neurosci*, 35(24), 9194-9204. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0919-15.2015>
- Roldán, M., & Kyriacou, P. A. (2021). Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) in Traumatic Brain Injury (TBI). *Sensors*, 21(5), 1586. <https://doi.org/10.3390/s21051586>
- Roozenbeek, B., Lingsma, H. F., Lecky, F. E., Lu, J., Weir, J., Butcher, I., . . . Steyerberg, E. W. (2012). Prediction of outcome after moderate and severe traumatic brain injury: External validation of the International Mission on Prognosis and Analysis of Clinical Trials (IMPACT) and Corticoid Randomisation After Significant Head injury (CRASH) prognostic models*. *Critical Care Medicine*, 40(5). https://journals.lww.com/ccmjournals/Fulltext/2012/05000/Prediction_of_outcome_after_moderate_and_severe.28.aspx
- Roozenbeek, B., Maas, A. I., & Menon, D. K. (2013). Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol*, 9(4), 231-236. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.22>
- Roozenbeek, B., Maas, A. I. R., & Menon, D. K. (2013). Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury. *Nature Reviews Neurology*, 9(4), 231-236. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.22>
- Rose, J. C., Neill, T. A., & Hemphill, J. C., III. (2006). Continuous monitoring of the microcirculation in neurocritical care: an update on brain tissue oxygenation. *Current Opinion in Critical Care*, 12(2). https://journals.lww.com/cocriticalcare/Fulltext/2006/04000/Continuous_monitoring_of_the_microcirculation_in.6.aspx
- Rostami, E., Davidsson, J., Ng, K. C., Lu, J., Gyorgy, A., Wingo, D., . . . Risling, M. (2012). A Model for Mild Traumatic Brain Injury that Induces Limited Transient Memory Impairment and Increased Levels of Axon Related Serum Biomarkers. *Frontiers in Neurology*, 3, 115. 10.3389/fneur.2012.00115. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2012.00115>
- Rovegno, M., Soto, P. A., Sáez, J. C., & von Bernhardt, R. (2012). Biological mechanisms involved in the spread of traumatic brain damage. *Medicina Intensiva (English Edition)*, 36(1), 37-44. 10.1016/j.medine.2012.02.002. <https://doi.org/10.1016/j.medine.2012.02.002>
- Rovlias, A., & Kotsou, S. (2000). The influence of hyperglycemia on neurological outcome in patients with severe head injury. *Neurosurgery*, 46(2), 335-342; discussion 342-333. <https://doi.org/10.1097/00006123-200002000-00015>
- Rubin, T. G., & Lipton, M. L. (2019). Sex Differences in Animal Models of Traumatic Brain Injury. *J Exp Neurosci*, 13, 1179069519844020. <https://doi.org/10.1177/1179069519844020>
- Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen.
- Saatman, K. E., Duhaime, A.-C., Bullock, R., Maas, A. I. R., Valadka, A., & Manley, G. T. (2008). Classification of Traumatic Brain Injury for Targeted Therapies. *Journal of Neurotrauma*, 25(7), 719-738. <https://doi.org/10.1089/neu.2008.0586>
- Salehi, A., Zhang, J. H., & Obenaus, A. (2017). Response of the cerebral vasculature following traumatic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 37(7), 2320-2339. <https://doi.org/10.1177/0271678x17701460>
- Salmond, C. H., Menon, D. K., Chatfield, D. A., Williams, G. B., Pena, A., Sahakian, B. J., & Pickard, J. D. (2006). Diffusion tensor imaging in chronic head injury survivors: correlations with learning and memory indices. *Neuroimage*, 29(1), 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.07.012>
- Salvador, E., Burek, M., & Förster, C. Y. (2018). An In Vitro Model of Traumatic Brain Injury. Dans B. Tharakan (édit.), *Traumatic and Ischemic Injury: Methods and Protocols* (p. 219-227). Springer New York.

- San Martín Molina, I., Salo, R. A., Abdollahzadeh, A., Tohka, J., Gröhn, O., & Sierra, A. (2020). In Vivo Diffusion Tensor Imaging in Acute and Subacute Phases of Mild Traumatic Brain Injury in Rats. *eneuro*, 7(3), ENEURO.0476-0419. <https://doi.org/10.1523/eneuro.0476-19.2020>
- Sanchez, G. M., & Burridge, A. L. (2007). Decision making in head injury management in the Edwin Smith Papyrus. *Neurosurg Focus*, 23(1), E5. <https://doi.org/10.3171/foc.2007.23.1.5>
- Sara A, M. (2020). Metacognitive skills training effect on cognitive function in traumatic brain injury patients: A systematic review. *Global Journal of Medical and Clinical Case Reports*, 085-099. <https://doi.org/10.17352/2455-5282.000107>
- Schmidt, R. H., & Grady, M. S. (1993). Regional patterns of blood-brain barrier breakdown following central and lateral fluid percussion injury in rodents. *J Neurotrauma*, 10(4), 415-430. <https://doi.org/10.1089/neu.1993.10.415>
- Schneider, H. J., Kreitschmann-Andermahr, I., Ghigo, E., Stalla, G. K., & Agha, A. (2007). Hypothalamopituitary dysfunction following traumatic brain injury and aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review. *Jama*, 298(12), 1429-1438. <https://doi.org/10.1001/jama.298.12.1429>
- Schoettker, P., Mustaki, J.-P., Porchet, F., & Fishman, D. (2001). Prise en charge des traumatismes crâniens en médecine pré-hospitalière: pourquoi et comment. *Médecine et hygiène*, 59(2363), 1936-1939.
- Schofield, P. W., & Doty, R. L. (2019). Chapter 23 - The influence of head injury on olfactory and gustatory function. Dans R. L. Doty (édit.), *Handbook of Clinical Neurology* (vol. 164, p. 409-429). Elsevier.
- Seel, R. T., Kreuzer, J. S., Rosenthal, M., Hammond, F. M., Corrigan, J. D., & Black, K. (2003). Depression after traumatic brain injury: a National Institute on Disability and Rehabilitation Research Model Systems multicenter investigation. *Arch Phys Med Rehabil*, 84(2), 177-184. <https://doi.org/10.1053/apmr.2003.50106>
- Sell, S. L., Johnson, K., DeWitt, D. S., & Prough, D. S. (2017). Persistent Behavioral Deficits in Rats after Parasagittal Fluid Percussion Injury. *J Neurotrauma*, 34(5), 1086-1096. <https://doi.org/10.1089/neu.2016.4616>
- Selwyn, R., Hokenbury, N., Jaiswal, S., Mathur, S., Armstrong, R., & Byrnes, K. (2013). Mild Traumatic Brain Injury Results in Depressed Cerebral Glucose Uptake: An ¹⁸F-FDG PET Study. *Journal of neurotrauma*, 30. <https://doi.org/10.1089/neu.2013.2928>
- Seo, J. P., & Jang, S. H. (2013). Traumatic thalamic injury demonstrated by diffusion tensor tractography of the spinothalamic pathway. *Brain Inj*, 27(6), 749-753. <https://doi.org/10.3109/02699052.2013.771794>
- Sergio, F., Angelo, S., Kristen, T. T., & Joshua, K. (2016). Cerebral blood flow and autoregulation: current measurement techniques and prospects for noninvasive optical methods. *Neurophotonics*, 3(3), 1-31. <https://doi.org/10.1117/1.NPh.3.3.031411>
- Sevmez, F., Adanir, S. S., & Ince, R. (2020). Legendary name of neuroscience: Phineas Gage (1823–1860). *Child's Nervous System*. <https://doi.org/10.1007/s00381-020-04595-6>
- Shaefi, S., Mittel, A. M., Hyam, J. A., Boone, M. D., Chen, C. C., & Kasper, E. M. (2016). Hypothermia for severe traumatic brain injury in adults: Recent lessons from randomized controlled trials. *Surg Neurol Int*, 7, 103. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.194816>
- Sharma, S., Tiarks, G., Haight, J., & Bassuk, A. G. (2021). Neuropathophysiological Mechanisms and Treatment Strategies for Post-traumatic Epilepsy. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.612073>
- Shear, D. A., Lu, X. C., Bombard, M. C., Pedersen, R., Chen, Z., Davis, A., & Tortella, F. C. (2010). Longitudinal characterization of motor and cognitive deficits in a model of penetrating ballistic-like brain injury. *J Neurotrauma*, 27(10), 1911-1923. <https://doi.org/10.1089/neu.2010.1399>
- Shepard, S. R., Ghajar, J. B. G., Giannuzzi, R., Kupferman, S., & Hariri, R. J. (1991). Fluid percussion barotrauma chamber: A new in vitro model for traumatic brain injury. *Journal of Surgical Research*, 51(5), 417-424. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-4804\(91\)90144-B](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-4804(91)90144-B)

- Shively, S., Scher, A. I., Perl, D. P., & Diaz-Arrastia, R. (2012). Dementia Resulting From Traumatic Brain Injury. *Archives of Neurology*, 69(10). <https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.3747>
- Shohami, E., Novikov, M., & Bass, R. (1995). Long-term effect of HU-211, a novel non-competitive NMDA antagonist, on motor and memory functions after closed head injury in the rat. *Brain Research*, 674(1), 55-62. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)01433-i](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)01433-i)
- Shultz, S. R., Cardamone, L., Liu, Y. R., Hogan, R. E., Maccotta, L., Wright, D. K., . . . Boullieret, V. (2013). Can structural or functional changes following traumatic brain injury in the rat predict epileptic outcome? *Epilepsia*, 54(7), 1240-1250. <https://doi.org/10.1111/epi.12223>
- Shultz, S. R., MacFabe, D. F., Foley, K. A., Taylor, R., & Cain, D. P. (2011). A single mild fluid percussion injury induces short-term behavioral and neuropathological changes in the Long-Evans rat: Support for an animal model of concussion. *Behavioural Brain Research*, 224(2), 326-335. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.06.012>
- Sick, T., Wasserman, J., Bregy, A., Sick, J., Dietrich, W. D., & Bramlett, H. M. (2017). Increased Expression of Epileptiform Spike/Wave Discharges One Year after Mild, Moderate, or Severe Fluid Percussion Brain Injury in Rats. *J Neurotrauma*, 34(16), 2467-2474. <https://doi.org/10.1089/neu.2016.4826>
- Signorini, D. F., Andrews, P. J., Jones, P. A., Wardlaw, J. M., & Miller, J. D. (1999). Adding insult to injury: the prognostic value of early secondary insults for survival after traumatic brain injury. *Journal of neurology, neurosurgery & psychiatry*, 66(1), 26-31.
- Singh, P., Doshi, S., Spaethling, J. M., Hockenberry, A. J., Patel, T. P., Geddes-Klein, D. M., . . . Meaney, D. F. (2012). N-methyl-D-aspartate receptor mechanosensitivity is governed by C terminus of NR2B subunit. *J Biol Chem*, 287(6), 4348-4359. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.253740>
- Skandsen, T., Kvistad, K. A., Solheim, O., Strand, I. H., Folvik, M., & Vik, A. (2010). Prevalence and impact of diffuse axonal injury in patients with moderate and severe head injury: a cohort study of early magnetic resonance imaging findings and 1-year outcome. *Journal of Neurosurgery JNS*, 113(3), 556. <https://doi.org/10.3171/2009.9.Jns09626>
- Skidmore, E. R. (2015). Training to Optimize Learning After Traumatic Brain Injury. *Current Physical Medicine and Rehabilitation Reports*, 3(2), 99-105. <https://doi.org/10.1007/s40141-015-0081-6>
- Smith, D., Rau, T., Poulsen, A., Macwilliams, Z., Patterson, D., Kelly, W., & Poulsen, D. (2018). Convulsive seizures and EEG spikes after lateral fluid-percussion injury in the rat. *Epilepsy Research*, 147, 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2018.09.005>
- Smith, D. H., Chen, X. H., Pierce, J. E., Wolf, J. A., Trojanowski, J. Q., Graham, D. I., & McIntosh, T. K. (1997). Progressive atrophy and neuron death for one year following brain trauma in the rat. *J Neurotrauma*, 14(10), 715-727. <https://doi.org/10.1089/neu.1997.14.715>
- Smith, M. (2008). Monitoring Intracranial Pressure in Traumatic Brain Injury. *Anesthesia & Analgesia*, 106(1). https://journals.lww.com/anesthesia-analgesia/Fulltext/2008/01000/Monitoring_Intracranial_Pressure_in_Traumatic.42.aspx
- Song, Y. M., Qian, Y., Su, W. Q., Liu, X. H., Huang, J. H., Gong, Z. T., . . . Jiang, R. C. (2019). Differences in pathological changes between two rat models of severe traumatic brain injury. *Neural Regen Res*, 14(10), 1796-1804. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.257534>
- Sotocinal, S. G., Sorge, R. E., Zaloum, A., Tuttle, A. H., Martin, L. J., Wieskopf, J. S., . . . Mogil, J. S. (2011). The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain*, 7, 55. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-55>
- Spani, C. B., Braun, D. J., & Van Eldik, L. J. (2018). Sex-related responses after traumatic brain injury: Considerations for preclinical modeling. *Front Neuroendocrinol*, 50, 52-66. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.03.006>
- Sparke, A. (2021). *Bones of the Skull*. January 12, 2021. <https://teachmeanatomy.info/head/osteology/skull/>
- Squires, R. F., Saederup, E., Crawley, J. N., Skolnick, P., & Paul, S. M. (1984). Convulsant potencies of tetrazoles are highly correlated with actions on GABA/benzodiazepine/picrotoxin receptor

- complexes in brain. *Life Sciences*, 35(14), 1439-1444. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(84\)90159-0](https://doi.org/10.1016/0024-3205(84)90159-0)
- Stålhammar, D. (1975). EXPERIMENTAL BRAIN DAMAGE FROM FLUID PRESSURES DUE TO IMPACT ACCELERATION. 1. Design of Experimental Procedure. *Acta Neurologica Scandinavica*, 52(1), 7-26. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1975.tb02824.x>
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1975.tb02824.x>
- Stein, D. G. (2015). Embracing failure: What the Phase III progesterone studies can teach about TBI clinical trials. *Brain Inj*, 29(11), 1259-1272. <https://doi.org/10.3109/02699052.2015.1065344>
- Steyerberg, E. W., Mushkudiani, N., Perel, P., Butcher, I., Lu, J., McHugh, G. S., . . . Maas, A. I. (2008). Predicting outcome after traumatic brain injury: development and international validation of prognostic scores based on admission characteristics. *PLoS Med*, 5(8), e165; discussion e165. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050165>
- Stocker, R. A. (2019). Intensive Care in Traumatic Brain Injury Including Multi-Modal Monitoring and Neuroprotection. *Medical Sciences*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/medsci7030037>
- Stokum, J. A., Gerzanich, V., & Simard, J. M. (2016). Molecular pathophysiology of cerebral edema. *J Cereb Blood Flow Metab*, 36(3), 513-538. <https://doi.org/10.1177/0271678x15617172>
- Sun, D., McGinn, M. J., Zhou, Z., Harvey, H. B., Bullock, M. R., & Colello, R. J. (2007). Anatomical integration of newly generated dentate granule neurons following traumatic brain injury in adult rats and its association to cognitive recovery. *Experimental Neurology*, 204(1), 264-272. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.11.005>
- Susan L. Hillier, M. H. S. (1997). Outcomes 5 years post traumatic brain injury (with further reference to neurophysical impairment and disability). *Brain Injury*, 11(9), 661-675. <https://doi.org/10.1080/026990597123214>
- Suzuki, T., Bramlett, H. M., & Dietrich, W. D. (2003). The importance of gender on the beneficial effects of posttraumatic hypothermia. *Exp Neurol*, 184(2), 1017-1026. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00389-3](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00389-3)
- Svedung Wettervik, T. M., Engquist, H., Lenell, S., Howells, T., Hillered, L., Rostami, E., . . . Enblad, P. (2020). Systemic Hyperthermia in Traumatic Brain Injury-Relation to Intracranial Pressure Dynamics, Cerebral Energy Metabolism, and Clinical Outcome. *J Neurosurg Anesthesiol*. <https://doi.org/10.1097/ana.0000000000000695>
- Tagliaferri, F., Compagnone, C., Korsic, M., Servadei, F., & Kraus, J. (2006). A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir (Wien)*, 148(3), 255-268; discussion 268. <https://doi.org/10.1007/s00701-005-0651-y>
- Talamonti, G., D'Aliberti, G., & Cenzato, M. (2020). Aulus Cornelius Celsus and the Head Injuries. *World Neurosurg*, 133, 127-134. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.09.119>
- Teasdale, G., & Jennett, B. (1974). Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet*, 2(7872), 81-84. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(74\)91639-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(74)91639-0)
- Teasdale, G., & Jennett, B. (1976). Assessment and prognosis of coma after head injury. *Acta Neurochirurgica*, 34(1-4), 45-55. <https://doi.org/10.1007/bf01405862>
- Tehse, J., & Taghibiglou, C. (2018). The Overlooked Aspect of Excitotoxicity: Glutamate-Independent Excitotoxicity in Traumatic Brain Injuries. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/ejn.14307>
- Teles Filho, R. V. (2020). Phineas Gage's great legacy. *Dementia & Neuropsychologia*, 14, 419-421.
- Thompson, H. J., Lifshitz, J., Marklund, N., Grady, M. S., Graham, D. I., Hovda, D. A., & McIntosh, T. K. (2005). Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation. *J Neurotrauma*, 22(1), 42-75. <https://doi.org/10.1089/neu.2005.22.42>
- Thornhill, S., Teasdale, G. M., Murray, G. D., McEwen, J., Roy, C. W., & Penny, K. I. (2000). Disability in young people and adults one year after head injury: prospective cohort study. *Bmj*, 320(7250), 1631-1635. <https://doi.org/10.1136/bmj.320.7250.1631>
- Toth, P., Szarka, N., Farkas, E., Ezer, E., Czeiter, E., Amrein, K., . . . Koller, A. (2016). Traumatic brain injury-induced autoregulatory dysfunction and spreading depression-related neurovascular uncoupling: Pathomechanisms, perspectives, and therapeutic implications. *American Journal*

- of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 311(5), H1118-H1131. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00267.2016>
- Toth, P., Szarka, N., Farkas, E., Ezer, E., Czeiter, E., Amrein, K., . . . Koller, A. (2016). Traumatic brain injury-induced autoregulatory dysfunction and spreading depression-related neurovascular uncoupling: Pathomechanisms, perspectives, and therapeutic implications. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 311(5), H1118-h1131. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00267.2016>
- Tribunals, N. M. (1949). Trials of war criminals before the Nuernberg Military Tribunals under Control Council Law No. 10. Volume IV: "The Einsatzgruppen Case" and "The Rusha Case." Washington: US Government Printing Office.
- Tsaousides, T., & Gordon, W. A. (2009). Cognitive rehabilitation following traumatic brain injury: assessment to treatment. *Mt Sinai J Med*, 76(2), 173-181. <https://doi.org/10.1002/msj.20099>
- Tseng, W. C., Shih, H. M., Su, Y. C., Chen, H. W., Hsiao, K. Y., & Chen, I. C. (2011). The association between skull bone fractures and outcomes in patients with severe traumatic brain injury. *J Trauma*, 71(6), 1611-1614; discussion 1614. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e31823a8a60>
- Tubi, M. A., Lutkenhoff, E., Blanco, M. B., McArthur, D., Villablanca, P., Ellingson, B., . . . Vespa, P. M. (2019). Early seizures and temporal lobe trauma predict post-traumatic epilepsy: A longitudinal study. *Neurobiology of Disease*, 123, 115-121. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.05.014>
- Tupper, D. E., & Wallace, R. B. (1980). Utility of the neurological examination in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 40(6), 999-1003.
- Unterberg, A. W., Stover, J., Kress, B., & Kiening, K. L. (2004). Edema and brain trauma. *Neuroscience*, 129(4), 1021-1029. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.06.046>
- Uzan, M., Erman, H., Tanriverdi, T., Sanus, G. Z., Kafadar, A., & Uzun, H. (2006). Evaluation of apoptosis in cerebrospinal fluid of patients with severe head injury. *Acta Neurochir (Wien)*, 148(11), 1157-1164; discussion. <https://doi.org/10.1007/s00701-006-0887-1>
- VALDES SOCIN, H. G., Daniel, S., & Beckers, A. (2018). HYPOPITUITARISME CONSÉCUTIF AU TRAUMATISME CRÂNIEN. *Neurone*, 3, 26-32.
- van de Looij, Y., Mauconduit, F., Beaumont, M., Valable, S., Farion, R., Francony, G., . . . Lahrech, H. (2012). Diffusion tensor imaging of diffuse axonal injury in a rat brain trauma model. *NMR Biomed*, 25(1), 93-103. <https://doi.org/10.1002/nbm.1721>
- Van Horn, J. D., Irimia, A., Torgerson, C. M., Chambers, M. C., Kikinis, R., & Toga, A. W. (2012). Mapping Connectivity Damage in the Case of Phineas Gage. *PLOS ONE*, 7(5), e37454. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037454>
- Van Praag, D. L. G., Cnossen, M. C., Polinder, S., Wilson, L., & Maas, A. I. R. (2019). Post-Traumatic Stress Disorder after Civilian Traumatic Brain Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prevalence Rates. *J Neurotrauma*, 36(23), 3220-3232. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.5759>
- van Vliet, E. A., Ndode-Ekane, X. E., Lehto, L. J., Gorter, J. A., Andrade, P., Aronica, E., . . . Pitkänen, A. (2020). Long-lasting blood-brain barrier dysfunction and neuroinflammation after traumatic brain injury. *Neurobiology of Disease*, 145, 105080. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105080>
- Varelas, P. N., Eastwood, D., Yun, H. J., Spanaki, M. V., Hacein Bey, L., Kessar, C., & Gennarelli, T. A. (2006). Impact of a neurointensivist on outcomes in patients with head trauma treated in a neurosciences intensive care unit. *J Neurosurg*, 104(5), 713-719. <https://doi.org/10.3171/jns.2006.104.5.713>
- Vasbinder, M. A., Hawk, C. T., & Bennett, B. T. (2014). Chapter 3 - Regulations, Policies, and Guidelines Impacting Laboratory Animal Welfare. Dans K. Bayne & P. V. Turner (édit.), *Laboratory Animal Welfare* (p. 17-28). Academic Press.
- Vasquez, B. P., Tomaszczyk, J. C., Sharma, B., Colella, B., & Green, R. E. A. (2018). Longitudinal Recovery of Executive Control Functions After Moderate-Severe Traumatic Brain Injury: Examining Trajectories of Variability and Ex-Gaussian Parameters. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 32(3), 191-199. <https://doi.org/10.1177/1545968318760727>

- Vespa, P., McArthur, D. L., Stein, N., Huang, S. C., Shao, W., Filippou, M., . . . Hovda, D. A. (2012). Tight glycemic control increases metabolic distress in traumatic brain injury: a randomized controlled within-subjects trial. *Crit Care Med*, 40(6), 1923-1929. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31824e0fcc>
- Vink, R., Mullins, P. G., Temple, M. D., Bao, W., & Faden, A. I. (2001). Small shifts in craniotomy position in the lateral fluid percussion injury model are associated with differential lesion development. *J Neurotrauma*, 18(8), 839-847. <https://doi.org/10.1089/089771501316919201>
- Von Baumgarten, L., Trabold, R., Thal, S., Back, T., & Plesnila, N. (2008). Role of Cortical Spreading Depressions for Secondary Brain Damage after Traumatic Brain Injury in Mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 28(7), 1353-1360. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.30>
- von Bornstädt, D., Houben, T., Seidel, J. L., Zheng, Y., Dilekoz, E., Qin, T., . . . Ayata, C. (2015). Supply-Demand Mismatch Transients in Susceptible Peri-infarct Hot Zones Explain the Origins of Spreading Injury Depolarizations. *Neuron*, 85(5), 1117-1131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.007>
- Vorhees, C. V., & Williams, M. T. (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols*, 1(2), 848-858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116>
- Wahab, R. A., Neuberger, E. J., Lyeth, B. G., Santhakumar, V., & Pfister, B. J. (2015). Fluid percussion injury device for the precise control of injury parameters. *Journal of Neuroscience Methods*, 248, 16-26. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.03.010>
- Walker, W. C., & Pickett, T. C. (2007). Motor impairment after severe traumatic brain injury: A longitudinal multicenter study. *J Rehabil Res Dev*, 44(7), 975-982. <https://doi.org/10.1682/jrrd.2006.12.0158>
- Wanner, I. B., Deik, A., Torres, M., Rosendahl, A., Neary, J. T., Lemmon, V. P., & Bixby, J. L. (2008). A new in vitro model of the glial scar inhibits axon growth. *Glia*, 56(15), 1691-1709. <https://doi.org/10.1002/glia.20721>. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/glia.20721>
- Webster, K. M., Sun, M., Crack, P., O'Brien, T. J., Shultz, S. R., & Semple, B. D. (2017). Inflammation in epileptogenesis after traumatic brain injury. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0786-1>
- Weissberg, I., Wood, L., Kamintsky, L., Vazquez, O., Milikovsky, D. Z., Alexander, A., . . . Kaufer, D. (2015). Albumin induces excitatory synaptogenesis through astrocytic TGF- β /ALK5 signaling in a model of acquired epilepsy following blood-brain barrier dysfunction. *Neurobiology of Disease*, 78, 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.02.029>
- Werner, C., & Engelhard, K. (2007). Pathophysiology of traumatic brain injury. *BJA: British Journal of Anaesthesia*, 99(1), 4-9. <https://doi.org/10.1093/bja/aem131>
- Wijayatilake, D. S., Sherren, P. B., & Jigajinni, S. V. (2015). Systemic complications of traumatic brain injury. *Curr Opin Anaesthesiol*, 28(5), 525-531. <https://doi.org/10.1097/ACO.0000000000000236>
- Williams, A. J., Hartings, J. A., Lu, X. C., Rolli, M. L., Dave, J. R., & Tortella, F. C. (2005). Characterization of a new rat model of penetrating ballistic brain injury. *J Neurotrauma*, 22(2), 313-331. <https://doi.org/10.1089/neu.2005.22.313>
- Williams, W. H., Evans, J. J., Wilson, B. A., & Needham, P. (2002). Brief report: prevalence of post-traumatic stress disorder symptoms after severe traumatic brain injury in a representative community sample. *Brain Inj*, 16(8), 673-679. <https://doi.org/10.1080/02699050210128861>
- Wongchareon, K., Thompson, H. J., Mitchell, P. H., Barber, J., & Temkin, N. (2020). IMPACT and CRASH prognostic models for traumatic brain injury: external validation in a South-American cohort. *Inj Prev*, 26(6), 546-554. <https://doi.org/10.1136/injuryprev-2019-043466>
- Xiong, Y., Mahmood, A., & Chopp, M. (2013). Animal models of traumatic brain injury. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(2), 128-142. <https://doi.org/10.1038/nrn3407>
- Yağmur Çetin, T., İhsan, S., & Yasemin, G.-Ö. (2019). Spreading Depolarization Waves in Neurological Diseases: A Short Review about its Pathophysiology and Clinical Relevance. *Current*

- Neuropharmacology*, 17(2), 151-164.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/1570159X15666170915160707>
- Yarnell, A. M., Barry, E. S., Mountney, A., Shear, D., Tortella, F., & Grunberg, N. E. (2016). The Revised Neurobehavioral Severity Scale (NSS-R) for Rodents. *Current Protocols in Neuroscience*, 9.52.51-59.52.16. <https://doi.org/10.1002/cpns.10>
- Yoon, J. E., Lee, C. Y., Sin, E. G., Song, J., & Kim, H. W. (2018). Clinical Feature and Outcomes of Secondary Hydrocephalus Caused by Head Trauma. *Korean Journal of Neurotrauma*, 14(2), 86. <https://doi.org/10.13004/kjnt.2018.14.2.86>
- Yu, S., Kaneko, Y., Bae, E., Stahl, C. E., Wang, Y., van Loveren, H., . . . Borlongan, C. V. (2009). Severity of controlled cortical impact traumatic brain injury in rats and mice dictates degree of behavioral deficits. *Brain Res*, 1287, 157-163. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.06.067>
- Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W. (2016). ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 4350965. <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>
- Zhang, L., & Wang, H. (2018). Autophagy in Traumatic Brain Injury: A New Target for Therapeutic Intervention. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 190. 10.3389/fnmol.2018.00190. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2018.00190>
- Zhang, X., Chen, Y., Jenkins, L. W., Kochanek, P. M., & Clark, R. S. (2005). Bench-to-bedside review: Apoptosis/programmed cell death triggered by traumatic brain injury. *Crit Care*, 9(1), 66-75. <https://doi.org/10.1186/cc2950>
- Zhou, Y., Shao, A., Yao, Y., Tu, S., Deng, Y., & Zhang, J. (2020). Dual roles of astrocytes in plasticity and reconstruction after traumatic brain injury. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00549-2>
- Ziebell, J. M., Corrigan, F., & Vink, R. (2012). Animal models of mild and severe TBI: what have we learned in the past 30 years? Dans A. Maas, C. Morganti-Kossmann, & R. Raghupathi (édit.), *Traumatic Brain and Spinal Cord Injury: Challenges and Developments* (p. 114-125). Cambridge University Press.

ANNEXES

Annexe 1 – Chapitre publié

MONITORING BRAIN INJURY WITH MICROELECTRODE BIOSENSORS

Compendium of In Vivo Monitoring in Real-Time Molecular Neuroscience,
2019

Clélia Allieux^{*,†}, Anne Meiller^{*,‡}, Baptiste Balança^{*,‡,§}

and Stéphane Marinesco^{*,†,‡}

*INSERM U1028, CNRS UMR5292,

Lyon Neuroscience Research Center — CRNL, Team TIGER, and

†AniRA-Neurochem Technological Platform, Lyon, France

‡Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

§Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

¶Stephane.marinesco@univ-lyon1.fr

MONITORING BRAIN INJURY WITH MICROELECTRODE BIOSENSORS

Clélia Allieux, Anne Meiller, Baptiste Balança, and Stéphane Marinesco

Compendium of In Vivo Monitoring in Real-Time Molecular Neuroscience. November 2019, 325-364

https://doi.org/10.1142/9789811206238_0016

CHAPTER 16

MONITORING BRAIN INJURY WITH MICROELECTRODE BIOSENSORS

Clélia Allioux^{*,†}, Anne Meiller^{*,‡}, Baptiste Balança^{*,‡,§}
and Stéphane Marinesco^{*,†,‡,¶}

*INSERM U1028, CNRS UMR5292,
Lyon Neuroscience Research Center — CRNL, Team TIGER, and

[†]AniRA-Neurochem Technological Platform, Lyon, France

[‡]Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

[§]Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

[¶]Stephane.marinesco@univ-lyon1.fr

16.1 Introduction

Brain injuries caused by stroke or trauma can have devastating consequences and sometimes result in patients remaining comatose or with impaired consciousness for extended periods of time. Such patients represent a difficult challenge for physicians because they cannot respond to even simple clinical examination. Consequently, medical staff must rely on monitoring techniques to gain information about the state of the patient's brain. This is especially important during the first weeks following the initial injury, when unnoticed neurological complications can produce long-term disability or death.

16.1.1 Primary injury

Brain injury typically develops in two phases. Primary lesions occur at the time of the initial insult whereas secondary lesions start shortly afterward and can

continue to develop for several weeks. Primary injuries include ischemic or haemorrhagic insults occurring after a stroke, as a consequence of vessel occlusion or rupture. Early brain injuries often involve a global decrease in cerebral blood flow (CBF) and hydrocephaly if the presence of blood in the ventricles impairs the clearance of the cerebrospinal fluid; in subarachnoid haemorrhage (SAH), bleeding occurs in the subarachnoid space often in response to aneurysm rupture (Tholance, 2014; Grasso *et al.*, 2017). In traumatic brain injury (TBI), resulting from an external mechanical force applied to the skull, primary lesions are much more complex and heterogeneous. Diffuse TBI, characterized by global brain oedema immediately following the impact, is usually distinguished from focal TBI, which is characterized by extra and/or intraparenchymal bleeding. In focal TBI, part of the initial injury resembles that induced by haemorrhagic stroke (Zoerle *et al.*, 2017). The severity of all these early injuries is evaluated during the first physician contact using the Glasgow coma score. Patients who survived a severe initial injury and display persistent consciousness impairment are then transferred to a neurological critical care unit where clinicians will face two major challenges: (1) optimize brain energy supply to prevent secondary injury, and (2) detect the onset of new lesions in order to initiate rapid treatment.

16.1.2 Secondary injury

The primary phase of injury is often followed by a secondary phase characterized by an increased risk for neurological deterioration. Such neurological complications can occur between 1 and 15 days after admission to critical care. The likelihood of secondary lesions increases with the severity of the initial injury, as does the probability of lifelong disability (Bilgin *et al.*, 2012). Possible complications include progression of the initial insult into surrounding brain areas, epileptic seizures, or the occurrence of new lesions such as rebleeding in the case of hemorrhagic stroke. Delayed cerebral ischemia (DCI) can occur in 30% of SAH patients (Roos *et al.*, 2000; Tholance, 2014) and often leads to irreversible cerebral infarcts, resulting in death or severe disability in about half of the affected patients (Vergouwen *et al.*, 2010). DCI is probably caused by multiple factors acting in synergy, such as cerebral vasospasm and microvascular thrombosis (Vergouwen *et al.*, 2008), spreading depolarizations and spreading ischemia (Dreier *et al.*, 2009), impaired autoregulation of cerebral vascular tone (Otite *et al.*, 2014), and activation of inflammatory pathways in the brain (McMahon *et al.*, 2013).

Because secondary injuries can have devastating consequences, their prevention is of major importance. To this end, physicians need reliable biomarkers of brain function in comatose patients who are unable to communicate with clinical staff. Understanding the state of the patient's brain and its evolution after injury relies heavily on monitoring techniques that provide continuous physiological

measurements through a set of sensors permanently fitted on the brain. To improve the accuracy of diagnosis, several physical/chemical parameters are recorded in these patients, providing multimodal monitoring over several days.

16.2 Multimodal neurological monitoring in severely brain-injured patients

Upon admission to a neurological care unit, the patient undergoes standard monitoring of vital signs and peripheral markers, such as heart rate, mean arterial pressure, respiratory rate, body temperature, blood gases, and metabolites. In severely brain injured patients, who are often comatose and cannot communicate with caregivers, the state of the brain is monitored through multiple parameters including intracranial pressure, electrophysiological activity, brain hemodynamics, oxygenation, and metabolism (Figure 16.1). Secondary complications can develop

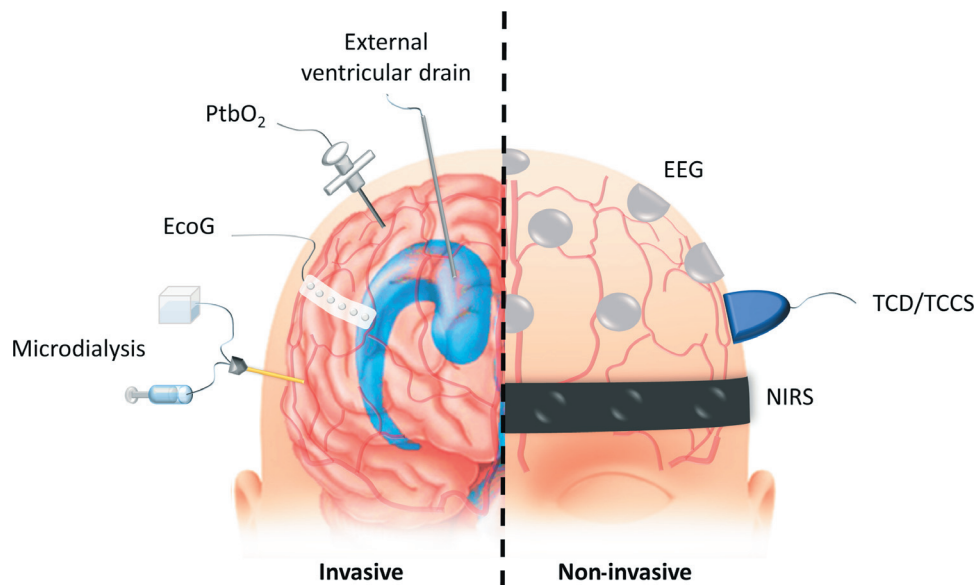


Figure 16.1 Schematic representation of multimodal monitoring techniques in neurointensive care. Different invasive (left) and non-invasive (right) tools can measure physiological parameters in the brain simultaneously. An external ventricular drain consists of a catheter inserted into the ventricles (blue) to extract excess cerebrospinal fluid in case of hydrocephaly and is often equipped with an intracranial pressure (ICP) sensor. Brain tissue oxygen partial pressure (PbtO₂) probes are implanted into the white matter. Near-infrared spectroscopy (NIRS) is a non-invasive tool used to estimate oxygen saturation in blood vessels near the skull. Cerebral blood flow (CBF) can be measured non-invasively using transcranial Doppler flowmetry coupled to color-coded duplex sonography (TCD/TCCS). Brain electrical activity can be detected via electroencephalography (EEG) and/or strip electrodes for electrocorticography (ECoG). Microdialysis probes are implanted in the parenchyma to monitor extracellular fluid chemistry (e.g. glucose, lactate, pyruvate concentrations).

rapidly and unexpectedly, and multimodal monitoring guarantees that the patient's brain is under constant surveillance so that appropriate measures can be taken in a timely manner (Roh and Park, 2016). Moreover, the state of the specific brain area in which the probes are placed can be a good indicator of the whole brain, especially after diffuse injury (Bouzat *et al.*, 2015).

16.2.1 Intracranial pressure

Intracranial pressure is of paramount importance since it determines cerebral perfusion pressure (CPP), defined as the mean arterial pressure minus intracranial pressure. As intracranial pressure increases, most often due to brain swelling and increases in blood or cerebrospinal fluid volume, CPP decreases and can lead to cerebral infarction when CBF falls below 15–20 ml/100 g/min (Botteri *et al.*, 2008). Typical physiological intracranial pressure values range between 3 and 15 mmHg with a pathological threshold usually set at 20 mmHg (Bratton *et al.*, 2007). Moreover, clinical outcome correlates well with the total duration of high intracranial pressure episodes (Guiza *et al.*, 2015). The gold standard technique for monitoring intracranial pressure is the external ventricular drain, a small pressure sensor mounted on a catheter implanted in the lateral ventricle. This system allows the physician to drain excess interstitial fluid and relieve intracranial pressure whenever it reaches a pathological level. In patients who do not need ventricular drainage, intraparenchymal microsensors (fiber-optic devices, strain gauge devices, or pneumatic sensors) are implanted. Depending on the mechanism of intracranial hypertension, several therapeutic strategies allow physicians to improve CPP, such as controlled hypertension, sedation, mild hypothermia, or decompressive craniotomy (Ragland and Lee, 2016). Intracranial pressure monitoring is part of the guidelines for the management of severe TBI and remains the subject of clinical research throughout the world (Chesnut *et al.*, 2012; Sarrafzadeh *et al.*, 2014).

16.2.2 Brain tissue oxygen

The brain is critically dependent on a continuous supply of oxygen from the blood. Oxygen is transported either dissolved in the serum or bound to haemoglobin in erythrocytes. The amount of oxygen available for brain cells is directly proportional to its partial pressure in the tissue (brain tissue oxygen partial pressure or PbtO₂). The value of PbtO₂ at any given point results from highly variable local factors such as distance from nearest vessels, intravascular PO₂, local O₂ diffusion, and consumption rates. Hence, at a micrometric scale, physiological oxygen tension varies within a broad range of 6 to 30 mmHg as determined by two-photon

microscopy in mice (Sakadzic *et al.*, 2010). In the human brain, PbtO₂ monitoring is achieved by implantable optical or electrochemical probes. Optical methods usually consist of an optical fiber terminated by a ruthenium dye that changes its fluorescence intensity in response to changes in PbtO₂ (Griffiths and Robinson, 1999). Alternatively, electrochemical methods rely on oxygen reduction by a platinum or carbon electrode, similar to the "Clark electrode" developed in the 1960s (Clark and Lyons, 1962; Bolger and Lowry, 2005). Given the large size of these probes (200 to 800 μm in diameter), PbtO₂ measurements in the ICU are a mix of capillary, intra- and extracellular oxygen concentrations. PbtO₂ probes are usually implanted in white matter where the physiological PbtO₂ ranges between 20 and 35 mmHg (De Georgia, 2015; Okonkwo *et al.*, 2017), and pathological thresholds indicative of brain hypoxia range between 10 and 20 mmHg. PbtO₂ below 15 mmHg has been associated with brain ischemia in patients with SAH (Hinzman *et al.*, 2010; Chesnut *et al.*, 2012) and PbtO₂ monitoring is recommended in TBI patients at risk for ischemic complications (Le Roux *et al.*, 2014).

A more recent non-invasive technique called near-infrared spectroscopy (NIRS) presents an elegant alternative to invasive probes. NIRS measures regional cerebral oxygen saturation (rSO₂) through the attenuation of a near-infrared light source emitted from the scalp. Because NIRS measures the saturation of blood haemoglobin with oxygen, it provides an indirect estimate of PbtO₂ in the cortical grey matter close to the scalp. Typically, values of rSO₂ <60% are considered pathological and probably result in a hypoxic brain (Davies *et al.*, 2015).

A decrease in PbtO₂ reflects a mismatch between brain oxygen supply and consumption. The first strategy usually adopted when PbtO₂ is below 20 mmHg includes CPP optimisation, a decrease in oxygen consumption (i.e. treatment of seizure or fever) and, eventually, an increase in oxygen delivery via an increased fraction of inspired oxygen and/or red blood cell transfusion (De Georgia, 2015; Okonkwo *et al.*, 2017). Overall, the combination of intracranial pressure and PbtO₂ monitoring represents a promising approach to improve long-term outcomes in acutely brain-injured patients (Stiefel *et al.*, 2005).

16.2.3 Brain hemodynamics

After acute brain injury, CBF often displays a heterogeneous distribution because of ischemic stroke, oedema, contusions, or other lesions. It is common practice to distinguish the ischemic core, in which brain perfusion is impaired and brain tissue is injured beyond recovery, from well-perfused remote areas. The penumbra corresponds to ischemic areas surrounding the ischemic core, in which brain tissue is still viable for rescue (Cunningham *et al.*, 2005). In TBI, there is increasing evidence for the existence of a "traumatic penumbra" of tissue most at risk of

secondary ischemic neuronal injury surrounding primary lesions (Botteri *et al.*, 2008). Therefore, assessment and monitoring of CBF is critical for both brain energy supply optimization and detection of new ischemic insults such as DCI after SAH (Stein *et al.*, 2006; Pluta *et al.*, 2009) or small vessel occlusion after traumatic injury (Vergouwen *et al.*, 2008).

Cerebral blood flow can be measured by a variety of imaging techniques. For example, computed tomography (CT) perfusion imaging reveals the penetration of inhaled Xenon into the brain parenchyma and provides useful information on regional CBF. Alternatively, angiography can visualize major blood vessels after administration of a contrast agent visible under X-ray radiation. Magnetic resonance imaging (MRI) can also measure cerebral perfusion by detecting brain penetration of Gadolinium injected intravenously. All these brain imaging techniques provide essential information about CBF but, unfortunately, they can only offer a snapshot of brain perfusion at a single time and cannot be repeated at short intervals (Wintermark *et al.*, 2005). These imaging techniques are therefore performed when continuous multimodal monitoring suggests a decrease in CBF.

Large vessels such as the middle cerebral artery or the internal carotid artery can be monitored at the bedside non-invasively using transcranial Doppler flowmetry coupled with color-coded duplex sonography (Proust *et al.*, 1999). This method measures the velocity of erythrocytes in large blood vessels; cerebral vasospasm presents as an increase in mean velocity. More specifically, an increased velocity in intracranial arteries coupled with normal velocity in the internal carotid is indicative of cerebral vasospasm. However, this technique cannot assess small vessels such as penetrating arterioles or capillaries, which would be more relevant to secondary injuries or DCI. Alternatively, parenchymal thermal diffusion probes can estimate local CBF from the dissipation of heat between two thermistors embedded in the brain parenchyma (Vajkoczy *et al.*, 2000).

Monitoring cerebral perfusion can be instrumental in the detection of new ischemic injuries in brain injured patients. However, consensus has not yet been reached regarding the pathological threshold values that could trigger medical intervention, and confirmation by brain imaging techniques is often considered mandatory in order to initiate therapy (Le Roux *et al.*, 2014).

16.2.4 Brain electrophysiological activity

The electrical signals generated by neurons during synaptic transmission and action potential propagation can be detected from the scalp by electroencephalography (EEG). EEG is mostly used for diagnostic and prognostic purposes (Korbakis and Vespa, 2017), but in some cases may also play a preventative role.

Frequency analysis of EEG signals can reveal a decrease in CBF before neuronal injury occurs. In particular, brain hypoperfusion is associated with an enrichment in low EEG frequencies that can be detected through Fourier analysis (Jordan, 2004; Balanca *et al.*, 2018). Moreover, EEG can detect epileptic seizures, a common neurological complication in brain injured patients, and trigger the timely administration of anti-epileptic drugs (Kurtz *et al.*, 2009). In addition to the detection of cerebral vasospasm and epileptic seizures, EEG can also reveal a disruption of sleep architecture that has been correlated to poor outcome in high-grade SAH patients (Claassen *et al.*, 2006). Specific patterns in EEG signals monitored in TBI patients can also reveal thalamic injury associated with poor outcomes (Hebb *et al.*, 2007).

An interesting development in electrophysiological brain monitoring has been the introduction of subdural strip electrodes, which monitor brain electrical activity from under the dura mater (a method called electrocorticography or ECoG), coupled to direct current (DC) recording. Monitoring ultra-low frequency electrophysiological events using DC ECoG has allowed the detection of cortical spreading depolarizations, waves of massive neuronal and glial depolarization that travel through the cortex at a speed of 2 to 4 mm/min (Dreier *et al.*, 2012). Spreading depolarizations are frequently detected in severely brain injured patients and are associated with poor outcome (Hartings *et al.*, 2011b). They are one of the mechanisms underlying cytotoxic oedema and occur whenever the cortical matter is injured (Dreier *et al.*, 2018). Therefore, their detection in comatose, brain-injured patients can help direct therapeutic intervention and detect the onset of new secondary lesion.

16.2.5 Brain energy metabolism

Glucose is by far the most important energy substrate of the brain. Glucose consumption by the brain accounts for almost 20% of the total glucose metabolism in the human body (Mergenthaler *et al.*, 2013). Once taken up by neurons, glucose is quickly metabolized into glucose-6-phosphate and pyruvate. Then, pyruvate enters the tricarboxylic acid cycle (also called the Krebs cycle) in the presence of oxygen which produces 30–34 molecules of adenosine-triphosphate (ATP) or undergoes non-oxidative glycolysis to produce lactate and only two molecules of ATP.

Analysing the chemical composition of the brain interstitial fluid and monitoring the concentrations of the major energy metabolites glucose, lactate and pyruvate over time can reveal critical information on the physiological/pathological state of the brain. For example, a healthy, well-oxygenated brain typically displays glucose extracellular concentrations in the 1.5–2.5 mM range,

lactate in the 2.5–3.5 mM range, and pyruvate around 0.15 mM (Reinstrup *et al.*, 2000; Schulz *et al.*, 2000). During periods of high neuronal activity, such as neuronal stimulation or cortical spreading depolarization, glucose demand increases and is usually partly compensated by a hyperemic response to increase glucose supply to the brain. Consequently, glucose extracellular concentration decreases, while pyruvate and lactate are produced. This situation of high cellular metabolism is called hypermetabolism. It is characterized by low glucose extracellular concentrations, and high lactate and pyruvate concentrations, and is usually associated with favourable outcome. In contrast, during hypoxia or ischemia, oxidative metabolism is impaired, and pyruvate is quickly degraded into lactate through non-oxidative glycolysis. Because this pathway produces less ATP than oxidative glycolysis, glucose consumption increases to meet the energetic demand of the brain tissue. This situation also occurs in cases of mitochondrial dysfunction, is referred to as metabolic crisis, and is associated with poor outcome. To help distinguish between these different brain metabolic states, the ratio of lactate over pyruvate concentrations (L/P) has been introduced (Vespa *et al.*, 2005) to reflect the level of oxidative glycolysis, which is itself a good indicator of the health of the brain tissue. L/P values above 40 are usually considered pathological and may indicate secondary neurological complications in brain injured patients (Stahl *et al.*, 2001).

The global metabolic state of the whole brain can be estimated by analysing the glucose, lactate, and oxygen concentrations in jugular blood and comparing them to arterial concentrations (Barcelos *et al.*, 2013). However, the most precise method is probably cerebral microdialysis. This method consists of implanting an intracerebral probe terminated by a semi-permeable dialysis catheter allowing the diffusion of small molecules through the probe. Artificial cerebrospinal fluid is circulated through the system and equilibrates with the endogenous interstitial medium before being collected and analysed by chromatography and/or mass spectrometry (Chefer *et al.*, 2009; Rogers and Boutelle, 2013; Hutchinson *et al.*, 2014). This technique is widely implemented in pre-clinical animal research, but also frequently used for the bedside monitoring of brain injured patients in neurological intensive care units (Carpenter *et al.*, 2017). Intracerebral microdialysis allows hourly estimates of glucose, lactate, and pyruvate at the bedside, and can also provide continuous measurements with the help of microfluidic devices and online chemical sensors (Rogers and Boutelle, 2013; Booth *et al.*, 2018). The major drawback of local metabolic monitoring is that brain metabolism can vary widely from one region to another. For example, microdialysis probes located away from areas subjected to DCI are unable to detect the metabolic changes characteristic of ischemia. This problem can be circumvented in SAH patients in whom the

location of infarcted brain areas can be predicted statistically based on the location of the initial bleeding (Tholance *et al.*, 2017). In addition, intracerebral microdialysis suffers from the large size of the probes implanted into the brain, with external diameters ranging from 210 to 500 μm (Venton *et al.*, 2006; Lietsche *et al.*, 2015). Microdialysis sampling is a rather invasive technique that can damage the blood-brain barrier and tissue surrounding the probe (Clapp-Lilly *et al.*, 1999; Bungay *et al.*, 2003; Borland *et al.*, 2005). Moreover, microdialysis probes likely induce inflammatory reactions in their vicinity, as revealed by the presence of increased interleukin-1 and -6 concentrations in the dialysates (Woodrooffe *et al.*, 1991). Overall, the presence of compromised tissue and inflammation around the probe could significantly alter the local concentrations of energy metabolites measured by microdialysis.

Microelectrode biosensors could present a promising avenue of research to provide miniaturized probes, minimize tissue damage, and perform more accurate measurements. This technology is not yet approved for clinical use in patients but has already been implemented in pre-clinical research involving animal models of brain injury.

16.3 Microelectrode biosensors

According to the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) an electrochemical biosensor is a self-contained integrated device, capable of providing specific quantitative or semi-quantitative analytical information using a biological recognition element (biochemical receptor) which is retained in direct spatial contact with an electrochemical transduction element (Thévenot *et al.*, 2001). For brain interstitial fluid analysis, biosensors are implanted within the brain parenchyma and their size cannot exceed a few hundreds of micrometers, justifying the term "microelectrode biosensor." The range of biological elements potentially available for biosensing is theoretically very large, and includes enzymes, antibodies, nucleic acid sequences and aptamers, molecularly imprinted polymers, and even whole cells or biological tissues (Thévenot *et al.*, 2001; Hamdan and Mohd Zain, 2014; Perumal and Hashim, 2014). However, brain monitoring is a specific case of analysis that requires continuous surveillance of vital signs and biochemical parameters over time. Single use electrochemical biosensors using antibodies, nucleic acid sequences, molecularly imprinted polymers, or protein receptors to achieve one-time recognition of a molecule are therefore poorly suited for monitoring applications. The only type of electrochemical biosensors currently used for continuous brain monitoring are enzyme-based microelectrode biosensors.

16.3.1 Principles of enzyme-based electrochemical biosensors

Enzyme-based microelectrode biosensors rely on the immobilization of an oxidoreductase enzyme on a microelectrode. These enzymes catalyze redox reactions of the type:



A is the electron donor (oxidizing agent) and B is the electron acceptor (reducing agent). The basic principle of enzyme-based electrochemical biosensors is therefore to shuttle some of the electrons involved in the redox reaction catalyzed by the enzyme to the electrode, thereby translating the concentration of the enzyme substrate into a measurable electrical current. Potentially hundreds of natural oxidoreductases are available for biosensor construction. However, only oxidases have been successfully immobilized on microelectrodes for brain monitoring so far. There are 143 natural enzymes which have been classified as oxidases (<http://www.brenda-enzymes.org>). They use oxygen as an electron acceptor and catalyze redox reactions of the type:



Reactions catalyzed by oxidases usually involve a cofactor, embedded within the protein backbone, which introduces an intermediate step. The most frequent cofactor is flavin adenine dinucleotide (FAD). Glucose oxidase, glutamate oxidase, choline oxidase, and D-amino acid oxidase, all widely used for microelectrode biosensor preparation, use FAD as their cofactor (Keilin and Hartree, 1952; Sato *et al.*, 1979; Pollegioni *et al.*, 1992; Arima *et al.*, 2003). A few enzymes use other cofactors, such as l-lactate oxidase, which contains flavin mononucleotide (FMN) (Yorita *et al.*, 1997) and xanthine oxidase, which binds two FAD molecules, two molybdenum atoms, and eight iron atoms (Enroth *et al.*, 2000). Consequently, the redox reaction catalyzed by oxidases is better described by a two-step reaction:

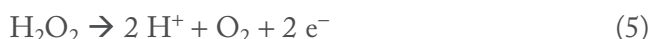


There are three strategies to transfer electrons to an electrode, corresponding to the so-called first, second, and third generation biosensors. In first generation biosensors, H_2O_2 is reoxidized into H_2O and O_2 at the electrode surface, with or without electron mediators. Second generation biosensors transfer electrons from the reduced cofactor (usually FADH_2) to the electrode by means of electron-conductive polymers that make them independent of ambient O_2 . Finally, third

generation biosensors provide direct electron transfer from the enzyme cofactor to the electrode by means of metal nanoparticles or carbon nanotubes (Borgmann *et al.*, 2012; Chatard *et al.*, 2018).

16.3.2 First generation biosensors

Hydrogen peroxide reoxidation into molecular oxygen follows this scheme:



Platinum (Pt) is the most widely used electrode material to catalyze H_2O_2 reoxidation. The mechanism of this reaction involves a first step of H_2O_2 adsorption on the Pt surface through Pt(OH) or Pt(OH)₂ species that are quickly oxidized into O_2 and H^+ (Hall *et al.*, 1999; Katsounaros *et al.*, 2012). The electrons released in the process generate an oxidation current that can be detected and measured to provide an estimate of the concentration of H_2O_2 produced by the enzyme and, hence, of the enzyme substrate in the ambient medium (Figure 16.2A).

H_2O_2 oxidation on Pt occurs at holding potentials above 200–300 mV *versus* Ag/AgCl (Vasylieva and Marinesco, 2013). Other noble metals like ruthenium or rhodium can also be employed. However, carbon fibers, which are widely used to make microelectrodes for brain dopamine detection, require higher holding potentials, of about 800 mV *versus* Ag/AgCl or more, to oxidize H_2O_2 . Carbon fiber microelectrodes can nonetheless be used for fast-scan cyclic voltammetric detection of H_2O_2 in the brain (Sanford *et al.*, 2010; Meunier *et al.*, 2018).

A major limitation of first generation biosensors is their oxygen dependence. In the brain, PO_2 is on average between 10 and 40 mmHg, which represents about 50–150 μM of dissolved O_2 in the interstitial fluid. This relatively low concentration means that if the concentration of enzyme substrate is in the 10^{-4} – 10^{-3} M range, as is the case for brain glucose or lactate, the biosensor response will be limited by ambient oxygen. A common solution to this problem is to cover the enzymatic membrane with an outer layer of polyurethane that reduces the diffusion of enzyme substrate to the biosensor. Consequently, the enzyme is exposed to lower substrate concentrations than those present in the ambient medium, so that O_2 is no longer limiting. Using this strategy, one can extend the linear range of the biosensor (the concentration range in which the biosensor's response is linear with concentration) by a factor of three or four, to reach 5–10 mM and allow accurate glucose or lactate detection (Yu *et al.*, 2006; Vasylieva *et al.*, 2015). Another interesting consequence is that the rate of the reaction at the biosensor is limited by mass transfer through the polyurethane layer, rather than by the enzyme kinetics. Consequently, the biosensor becomes less dependent on temperature, because the

336 C. Allieux et al.

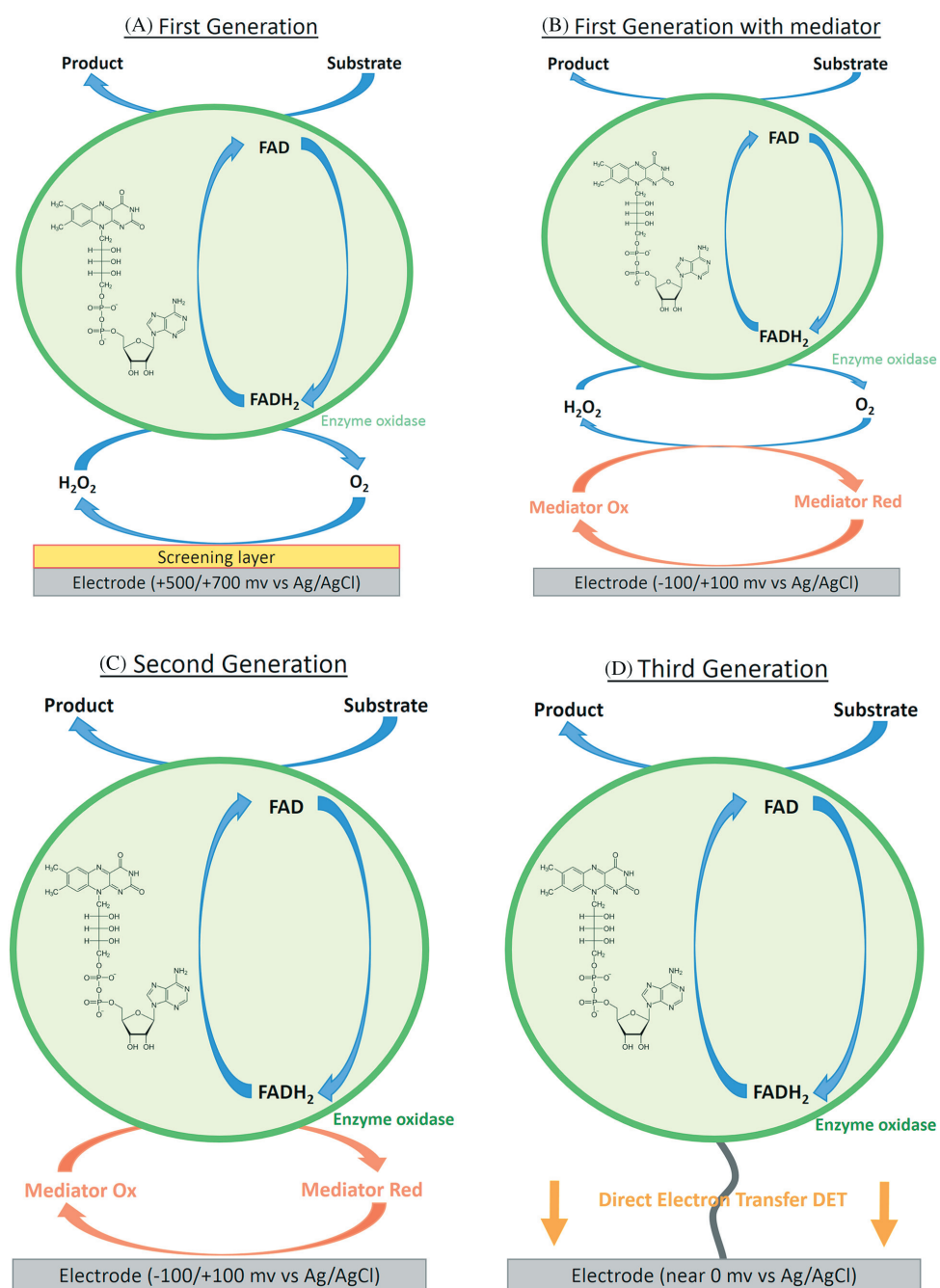


Figure 16.2 (Continued)

mass transfer process is less temperature dependent (about 2–3%/°C), than enzyme kinetics (about 8–10%/°C) (Bindra *et al.*, 1991; Wilson and Zhang, 2009). However, first generation microelectrode biosensors remain poorly suited to monitor the brain in situations of low ambient O₂ such as ischemia or hypoxia.

Another limitation of first generation biosensors is selectivity. To oxidize H₂O₂ optimally, microelectrode biosensors are polarized at 500 to 700 mV *versus* Ag/AgCl. However, many endogenous molecules present in the brain can also oxidize in this potential range. Antioxidant molecules like ascorbic acid or uric acid oxidize at 100–200 mV and 300 mV *versus* Ag/AgCl, respectively, and are present at high concentrations (up to 500 μM for ascorbic acid) (Miele and Fillenz, 1996; Euser *et al.*, 2009; Chatard *et al.*, 2018). In addition, neurotransmitters such as dopamine and serotonin and their metabolites (3,4-dihydroxyphenylacetic acid [DOPAC] and 5-hydroxyindoleacetic acid [5-HIAA], respectively) can also oxidize at carbon or Pt microelectrodes below 500 mV *versus* Ag/AgCl, and create non-specific signals related to their rapidly changing extracellular concentrations. There are two major strategies to overcome this problem: (1) a polymeric screening layer that allows H₂O₂ diffusion and blocks interfering molecules, or (2) chemical mediators that facilitate H₂O₂ oxidation and lowers its oxidation below that of interfering molecules.

16.3.2.1 Screening layers

Because H₂O₂ is a very small molecule compared to most endogenous oxidizable metabolites and neurotransmitters present *in vivo*, it is possible to use selective membranes that allow the diffusion of low molecular weight species while blocking larger molecules. Poly-phenylenediamine or poly-pyrrole can be readily electropolymerized on a microelectrode to create a steric barrier blocking the diffusion of molecules larger than 200 Da while allowing H₂O₂ to reach the electrode

Figure 16.2 (Figure on facing page) Schematic representation of electron transfer mechanisms in three generations of biosensors. Biosensors are based on the oxidation of a molecule of interest (substrate) by an oxidase enzyme that produces H₂O₂. (A) In first generation biosensors, H₂O₂ diffuses to the electrode surface and oxidation occurs with a holding potential ranging from +500 mV to +700 mV *versus* Ag/AgCl. A screening layer deposited on the electrode surface blocks interfering endogenous redox molecules such as ascorbic acid, uric acid, dopamine, or serotonin. (B) In some first generation biosensors an electron mediator lowers the oxidation potential of H₂O₂ to –100 mV to +100 mV *versus* Ag/AgCl in order to avoid electrochemical interference from endogenous redox molecules. (C) Second generation biosensors incorporate an electron mediator that exhibits higher affinity for the enzyme cofactor compared with O₂. Oxygen is therefore bypassed and the biosensor is independent of O₂. (D) In third generation biosensors, direct electron transfer (DET) is possible between the enzyme cofactor and the electrode surface. We should note that in second and third generation biosensors, dehydrogenases can also be used in addition to oxidases.

surface (Malitesta *et al.*, 1990; Quinto *et al.*, 2000; O'Neill *et al.*, 2004; Schuvailo *et al.*, 2006). Nafion, a perfluoro-sulfonated polymer, is also widely used as a screening layer on microelectrode biosensors. It is a permselective membrane that allows the diffusion of cations but not anions. It is efficient at blocking the non-specific detection of negatively charged molecules such as ascorbate and urate anions, as well as DOPAC and 5-HIAA. However, it will not prevent detection of cations such as dopamine and serotonin and might even increase the sensitivity of the biosensor for these molecules (Gerhardt *et al.*, 1984).

16.3.2.2 Electrochemical mediators

Another way of improving the selectivity of microelectrode biosensors is to lower their holding potential below that of oxidizable molecules present in the brain. One way to achieve this is to incorporate an electrochemical mediator to the enzyme layer. The oxidized form of the mediator can catalyze H_2O_2 oxidation while its reduced form can be reoxidized on the electrode surface at a lower potential than H_2O_2 (Figure 16.2B). For example, when horseradish peroxidase is added to the enzyme layer it can catalyze H_2O_2 oxidation into H_2O , and be reoxidized at the electrode surface at 0 to 100 mV *versus* Ag/AgCl (Belay *et al.*, 1999; Lindgren *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2007). Hexaferrocyanates such as prussian blue or ruthenium purple can also mediate H_2O_2 oxidation and lower the biosensor holding potential to -50 mV (Karyakin *et al.*, 1995, 2000; Tian and Dale, 2013). An adenosine-triphosphate microelectrode biosensor incorporating ruthenium purple in the enzyme layer has been used in brain slices (Tian *et al.*, 2007).

16.3.3 Second generation biosensors

Second generation biosensors are those in which the electron mediator achieves a higher rate of electron transfer with the enzyme cofactor than with O_2 (Figure 16.2C). Thus, reoxidation of the enzyme cofactor by ambient O_2 is bypassed and the biosensor is independent of brain PO_2 (Wang, 2008). This is especially important for monitoring the injured brain in situations of hypoxia or ischemia. Mediators such as ferrocene derivatives or poly(vinylimidazole), and poly(vinylpyridine) can achieve this goal (Frew and Hill, 1988), but such freely-diffusing mediators are at risk of leaking out of the enzyme layer. It is possible, however, to covalently tether the mediator to the enzyme layer by means of a polymeric mesh immobilized on the microelectrode. One of the early second generation biosensor designs involves poly(1-vinylimidazole), $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^+$ ions, and glucose oxidase cross-linked with poly(ethylene glycol) diglycidyl ether (PEGDE)

(Ohara *et al.*, 1993, 1994). Similar devices have been developed for the monitoring of brain glutamate (Kulagina *et al.*, 1999; Oldenziel and Westerink, 2005).

It is possible to completely eliminate the need for O₂ or an electron mediator by directly connecting the redox active center of the enzyme to the electrode, a process called direct electron transfer (DET, Figure 16.2D). Such devices have already been proposed, although never for *in vivo* implantation (Willner *et al.*, 1996; Bollella *et al.*, 2018). To achieve DET in a biosensor, a thorough understanding of the mechanisms of electron transfer within the enzyme is necessary. For example, Lee *et al.* (2018) achieved DET between a mutated FAD-dependent glucose dehydrogenase and an electrode through a self-assembled monolayer, and this was only possible through specific mutations in the enzyme, creating an electron transfer subunit, and tight control on the thickness of the monolayer. These advances in molecular design and bioengineering may lead someday to the development of implantable third generation microelectrode biosensors.

16.4 Microelectrode designs

During microelectrode biosensor fabrication, the material of the underlying electrode must be carefully chosen. First generation biosensors that rely on H₂O₂ reoxidation on the electrode surface must use Pt (or possibly ruthenium or rhodium) to catalyze this reaction; Pt is preferred as it is inert and non-toxic. When an electron mediator is incorporated into the enzyme layer, a wider variety of materials can be considered. For example, ruthenium purple biosensors for the detection of ATP or hypoxanthine in the brain were fabricated from gold microelectrodes (Tian *et al.*, 2007). Carbon is poorly suited for H₂O₂ detection because of the large overpotential required for its oxidation (usually between 0.8 and 1.2 *versus* Ag/AgCl), but carbon fibers are commercially available as extremely small fibers (5–10 μm external diameter) which are easy to manipulate by hand. Carbon fiber microelectrodes have been proposed for first generation biosensors using fast-scan cyclic voltammetry (Sanford *et al.*, 2010; Lugo-Morales *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2018), as well as in redox hydrogel-coated glutamate biosensors (Kulagina *et al.*, 1999; Oldenziel and Westerink, 2005; Oldenziel *et al.*, 2006b, a).

Notwithstanding these differences in electrode material, an important distinction in microelectrode biosensor design lies in the number of analytes that can be detected simultaneously by the device.

16.4.1 Single channel devices

The first microelectrodes designed for brain implantation in the 1950s consisted of a metallic wire in a glass capillary (Figures 16.3A and 16.3B). This design still

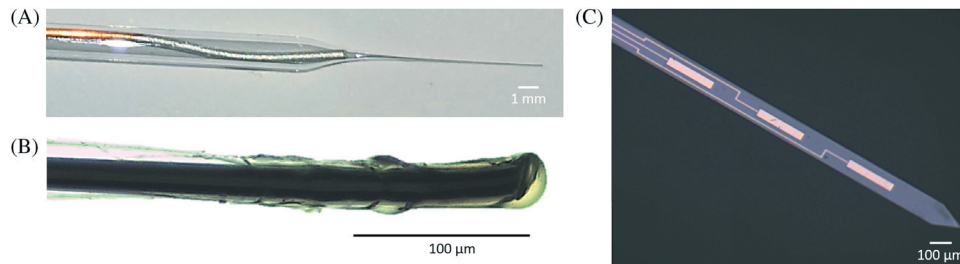
340 C. Allieux *et al.*

Figure 16.3 Examples of a single- and multi-channel biosensors. (A) and (B) Single enzymatic electrochemical biosensor is composed of a 25 μm diameter platinum-iridium wire extending 100 μm outside a pulled glass capillary. The biosensor tip is biofunctionalized with polyphenylenediamine and enzyme layers. Scale bars: 1 mm and 100 μm , respectively. (C) Electron microscopy image of a silicon/SU8 multichannel electrode as developed by Vasylieva *et al.* (2015). Scale bar: 100 μm . (Reproduced with permission from Vasylieva *et al.*, 2015.)

provides the thinnest microelectrodes to date, with external diameters ranging from 7 to 100 μm . It allows probe implantation in deep brain structures with minimal tissue damage (Gonon *et al.*, 1980; Netchiporouk *et al.*, 1995; Pernot *et al.*, 2008). Early glucose and lactate biosensors developed by Hu and Wilson (1997) included a 178 μm diameter Pt/Iridium (Ir) wire sealed into a glass micro-pipette and covered with glucose or lactate oxidase (Hu and Wilson, 1997). This microelectrode design is still in use today (Naylor *et al.*, 2012). More recent microelectrode designs have used small Pt/Ir or gold wires as well as carbon fibers to obtain even smaller devices in the 7–25 μm range (Kawagoe *et al.*, 1991; Tian *et al.*, 2007; Pernot *et al.*, 2008; Lugo-Morales *et al.*, 2013). Alternatively, commercially available teflon-coated Pt/Ir wires have also been proposed for use in enzyme biosensors (Lowry and O'Neill, 1994; Ryan *et al.*, 1997; McMahan and O'Neill, 2005). Including enzyme and polymer layers the outer diameter of such single-channel devices is in the 40–50 μm range. Unfortunately, such devices often suffer from poor reproducibility and high production costs due to their being hand-made. In addition, they can only detect a single analyte at a time. Many neuroscience applications demanding the detection of several analytes therefore require the implantation of several devices side by side, which can be a significant limitation in small laboratory animals.

16.4.2 Multichannel electrodes

Multichannel electrodes were developed with the advent of microfabrication and photolithographic techniques in the 1970s (Wise *et al.*, 1970; Pochay *et al.*, 1979). It is now possible to obtain multielectrode probes that minimize tissue damage through the use of flexible biocompatible materials coupled with small dimensions

(Weltin *et al.*, 2016). The microfabrication procedure usually involves (1) an initial step of metal deposition on a flat supporting material such as silicon, glass or ceramic, followed by (2) patterning with photolithography and lift-off techniques to define the number of electrodes, as well as their shape and connecting lines, and (3) etching of the substrate to obtain a needle-shaped device that is suitable for brain implantation (Figure 16.3C) (Frey *et al.*, 2010; Vasylieva *et al.*, 2015; Weltin *et al.*, 2016).

The first *in vivo* multielectrode biosensors, based on a ceramic substrate, were used for multisite dopamine (Sreenivas *et al.*, 1996) and glutamate (Burmeister *et al.*, 2000) detection in the brain. Silicon wafers have also been widely used for glutamate, lactate, and glucose detection (Wassum *et al.*, 2008; Vasylieva *et al.*, 2013). Such devices are larger than single channel microelectrodes embedded in glass micropipettes. Recent years have seen flexible substrates introduced to the field of *in vivo* brain biosensors. For example, glucose biosensors based on polyimide (Weltin *et al.*, 2014) or parylene substrates (Welch *et al.*, 2015) provide high flexibility and accommodate small brain movements in animals. This presents a promising avenue of research to improve the biocompatibility of brain implantable microelectrode biosensors.

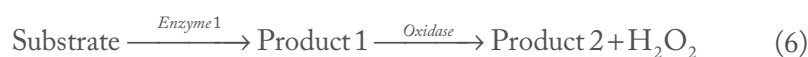
Typical size of ceramic or silicon needles is at least $50 \times 100 \mu\text{m}^2$, much larger than the $40 \mu\text{m}$ diameter achievable using glass micropipettes. The tissue lesions created upon brain implantation are therefore potentially larger with multi-channel microelectrodes. However, such devices are necessary for monitoring several molecules simultaneously, for example glucose and lactate (Vasylieva *et al.*, 2015; Lourenco *et al.*, 2017), choline and glutamate (Frey *et al.*, 2007, 2010), or choline and acetylcholine (Burmeister *et al.*, 2008). In addition, for neurotransmitters and metabolites present at low concentrations in the interstitial fluid, oxidation currents resulting from enzymatic activity are very low and other non-specific currents resulting from pH changes, local field potentials, or endogenous oxidizable molecules could interfere with selective detection of the molecule of interest. This is the case, for example, for glutamate and D-serine, two amino acids typically detected at concentrations between 1 and $3 \mu\text{M}$ (Pernot *et al.*, 2012; Maucler *et al.*, 2013; Vasylieva *et al.*, 2013). To perform these measurements as accurately as possible it is necessary to use a second control electrode covered with bovine serum albumin (BSA) instead of an enzyme, in order to measure these non-specific currents. Non-specific currents are then subtracted from the signal detected by the enzyme electrode to measure precisely the enzymatic currents and compute the concentration of the enzyme substrate around the electrode. This procedure is referred to as self-referencing (Burmeister and Gerhardt, 2001). This is often accomplished by implanting two microelectrodes side by side, but multielectrode devices offer the opportunity to perform this complex task with only one implantation.

342 C. Allieux *et al.*

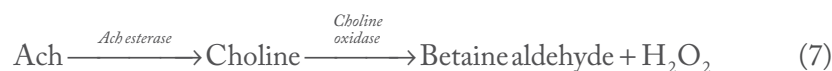
One important issue arising with multielectrode devices is the possibility of overlap of the diffusion layers of each electrode. Consequently, one electrode can decrease the concentration of oxygen (or enzyme substrate) available for the next electrode, or instead, release H_2O_2 outside the enzyme layer that could reach neighboring recording sites. However, such electrode cross-talk can be avoided by creating a recess within the ceramic or silicon needle, and by spacing adjacent microelectrodes by 200 μm (Vasylieva *et al.*, 2015).

16.5 Enzyme immobilization

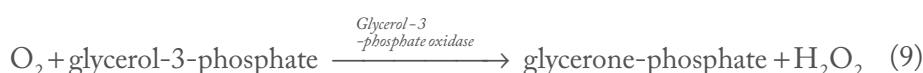
A second important aspect of enzyme biosensor technology is immobilization of the enzyme on the microelectrode. Some biosensor systems incorporate more than one enzyme to allow the recognition of a molecule for which no specific oxidase is available. In this case, the reaction taking place on the microelectrode is:



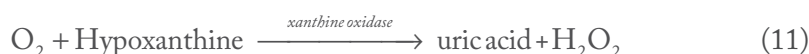
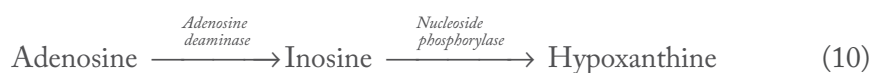
For example, there is no specific oxidase for acetylcholine (Ach) recognition, but it is possible to mix acetylcholine esterase with choline oxidase to obtain an acetylcholine biosensor through the following reaction:



Similarly, ATP can be detected using a two-enzyme mix:



and adenosine, with a mixture of three enzymes:



A wide variety of techniques can be used to achieve enzyme immobilization on a microelectrode while preserving enzymatic activity, rapid response time over a wide linear range, and providing stability for at least several hours of monitoring

in vivo. These techniques can be divided into (1) cross-linking methods involving covalent bonds, and (2) entrapment into polymer matrices (Vasylieva and Marinesco, 2013).

16.5.1 Cross-linking

Cross-linking is a process by which macromolecules are covalently bound, providing stable long-term binding to the microelectrode. It is usually achieved by bifunctional agents that react with amine and carboxylic groups on the surface of proteins, creating a ramified network. Glutaraldehyde (pentane-1,5-dialdehyde) is the most widely used cross-linking agent in biosensor technology. Although it is a small, toxic molecule, it provides stable immobilization a reaction time of a few minutes (Burmeister and Gerhardt, 2001; Pernot *et al.*, 2008; Wassum *et al.*, 2008). Another bifunctional molecule, PEGDE, is also frequently used in microelectrode biosensors. It was first proposed by Heller *et al.* for use in implantable glucose biosensors for diabetic patients, but was later adapted for brain monitoring (Gregg and Heller, 1991; Kulagina *et al.*, 1999; Heller and Feldman, 2008; Vasylieva *et al.*, 2011; von Bornstadt *et al.*, 2015). A non-toxic cross-linker bearing two epoxy groups on each end of a poly(ethylene glycol) chain, PEGDE reacts preferentially with amine groups on proteins. The reaction process, however, is slower than that of glutaraldehyde, and requires several hours with moderate heating (Vasylieva *et al.*, 2011). Many redox hydrogels used in second generation biosensors incorporate PEGDE as a cross-linker in the electron-conducting matrix. One of the first successful polymers of this type employed a polymer backbone of polyvinyl pyridine and metal-organic complexes of $\text{Os}^{2+/3+}$ with substituted and unsubstituted pyridines cross-linked with PEGDE to achieve electron transfer between the electrode and the enzyme (Gregg and Heller, 1991; Ohara *et al.*, 1993; Heller, 2006).

16.5.2 Enzyme entrapment

In enzyme entrapment, enzyme molecules are incorporated in a polymer layer by mixing them with the monomer solution during polymerization. Enzymes are embedded in the polymer via electrostatic interactions or simply adsorbed through weak chemical bonds that preserve enzyme activity (Vasylieva and Marinesco, 2013; Chatard *et al.*, 2018). Sol-gel matrices are especially suited for providing a porous environment capable of entrapping enzymes at a microelectrode surface. This method involves the hydrolysis of alkoxy silanes into reactive products that can polymerize on the electrode surface. Such reactions are often facilitated at alkaline pH. Negatively charged electrodes can trigger the reduction of H^+ to H_2

or nitrate ions to nitrite, thereby locally increasing pH around the electrode and triggering sol-gel polymerization (Shacham *et al.*, 1999; Tian *et al.*, 2009). This is a useful property for locally addressing enzymes to specific microelectrodes on multi-channel devices. Sol-gel-derived, silica-based materials are well-suited for such enzyme entrapment (Rozhanchuk *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2009).

Enzymes can also be entrapped during electropolymerization of a matrix such as polypyrrole or poly-phenylenediamine. Pyrrole-derived molecules can readily polymerize at a potential allowing the generation of pyrrole-cation radicals that react with neighboring monomers (usually around -700 mV *versus* Ag/AgCl) (Foulds and Lowe, 1986; Cosnier, 1999; Llaudet *et al.*, 2003). Phenylenediamine, although highly carcinogenic, can also be readily polymerized into poly-phenylenediamine to incorporate enzymes such as glucose oxidase, glutamate oxidase, or D-amino acid oxidase (Lowry *et al.*, 1997; McMahan and O'Neill, 2005; Zain *et al.*, 2010).

16.5.3 Effect of enzyme immobilization on substrate specificity

Biosensor selectivity is dependent on the specificity of the enzyme immobilized on the microelectrode. Very often, the oxidases used in brain monitoring experiments are either very selective for one substrate, like glutamate oxidase, or can accommodate other molecules as secondary substrates that are not present *in vivo*. For example, glucose oxidase also displays low activity towards 2-deoxy glucose, mannose and lactose, but the concentrations of these secondary substrates *in vivo* are not sufficient to interfere significantly with glucose detection (Vasylieva and Marinesco, 2013). D-amino acid oxidase can degrade all neutral and basic amino acids, but only D-serine is present *in vivo* in detectable concentration (Pernot *et al.*, 2008). However, the immobilization procedure can significantly impact enzyme-substrate specificity. Glutaraldehyde, in particular, often results in decreased enzyme specificity. It can increase mannose and lactose detection by glucose oxidase, or make glutamate oxidase capable of oxidizing asparagine, aspartate, and glutamine. This can have profound effects on quantitative concentration estimates provided by microelectrode biosensors *in vivo* (Vasylieva and Marinesco, 2013). This effect probably results from the small size (less than 1 nm long) of the glutaraldehyde molecule, which could constrain enzyme movements and affect its three dimensional structure during cross-linking. In contrast the larger molecule PEGDE (over 4 nm) does not impact enzyme substrate specificity. Moreover, the effects of glutaraldehyde on enzyme substrate specificity are attenuated when it is incubated in a solution of BSA prior to enzyme immobilization (Burmeister *et al.*, 2013). It is possible that under these conditions, enzyme immobilization is achieved by glutaraldehyde molecules already bound to BSA, thereby providing a longer chain for cross-linking enzyme molecules. Entrapment techniques do not appear to modify enzyme specificity (Vasylieva and Marinesco, 2013).

16.6 Microelectrode biosensors for monitoring brain injury

Biosensors are promising tools for monitoring the brain after acute injury. They meet most of the ASSURED criteria proposed by the World Health Organization to select most the efficient diagnostic methods. According to these criteria, a diagnostic method should be **A**ffordable, **S**ensitive, **S**pecific, **U**ser-friendly, **R**apid and robust, **E**quipment-free and **D**eliverable to end-users (Peeling *et al.*, 2006). Microelectrode biosensors have the potential to fulfill these criteria, not only in pre-clinical research laboratories but, perhaps, in brain-injured patients in the future. In addition to their high sensitivity and specificity, they also offer low-cost and compact equipment compared, for example, to microdialysis which requires offline analysis with chromatography or mass spectrometry. They also provide real-time analysis, which can be instrumental for rapidly informing therapy in time-sensitive cases such as brain injury.

So far, microelectrode biosensors have only been implemented in animal models. Pathological situations that have been monitored with these devices include epilepsy, middle cerebral artery occlusion, traumatic brain injury, and cortical spreading depolarizations.

16.6.1 Epileptic seizures

Epilepsy is a chronic neurological disorder characterized by recurrent seizures during which a group of brain cells displays excessive hypersynchronized activity, resulting in involuntary movements ranging from isolated muscle jerks to full body convulsions and, sometimes, loss of consciousness (<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>). A severe case of epilepsy is called *status epilepticus*, a situation of continuous intractable seizure “lasting more than 5 min or two or more seizures between which there is incomplete recovery of consciousness” (Lowenstein *et al.*, 1999). *Status epilepticus* induces neuronal injury and causes major neuronal loss particularly in the limbic system (Cavalheiro, 1995; Trinka *et al.*, 2012; Tyler *et al.*, 2012; Woeffler-Maucler *et al.*, 2014).

Microelectrode biosensors have helped understand the role of free radicals released during epileptic seizures in these neuronal injuries. Moon *et al.* focused on nitric oxide (NO) release in the rat cortex during pharmacologically-evoked seizures (Moon *et al.*, 2016). They designed an elegant dual-sensor microelectrode capable of measuring potassium and NO simultaneously. They detected a large NO release peaking around 0.2 μ M. Because NO is a highly reactive nitrogen species, this concentration could contribute to neuronal injury induced by prolonged seizures (Moon *et al.*, 2016).

Neurochemical studies of shorter, pharmacologically-evoked seizures have also been performed using microelectrode biosensors. The high temporal resolution of

346 C. Allieux *et al.*

these devices, on the order of a few seconds, is well suited for monitoring short epileptic seizures lasting only 30–60 s. Morales-Villagran *et al.* monitored glutamate extracellular concentration in the hippocampus of rats during epileptic seizures induced by the drug 4-aminopyridine (Morales-Villagran *et al.*, 2008). They detected an increase in glutamate level of about 5 μM within a few seconds of seizure onset, which supports a role for glutamate in seizure initiation. Evidence for increases in glutamate during epileptic seizures using microdialysis has been published by other teams in animals (Ueda and Tsuru, 1994; Kaura *et al.*, 1995; Khan *et al.*, 1999) and humans (During and Spencer, 1993). However, the temporal resolution of microdialysis is usually on the order of 2 to 5 min, which makes this technique ill-suited for analysis of neurotransmitter levels during seizures. Using capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence (CE-LIF), Parrot *et al.* achieved 20 s temporal resolution and detected a doubling of gamma-aminobutyric acid (GABA) levels during seizures compared to inter-ictal periods (Parrot *et al.*, 2004). However, this method could not determine whether the increase occurred at the onset or the termination of the seizure. Therefore, the second-by-second temporal resolution achieved by microelectrode biosensors represents a major improvement in the field of epilepsy research.

This methodological improvement was particularly evident in the study of Van Gompel *et al.* (2014), in which adenosine extracellular concentration was monitored in pig and human cortex during epileptic seizures. Simultaneous ECoG and electrochemical recording revealed that adenosine levels rose during seizures to reach a peak concentration 260% of baseline (649 ± 513 nM), 2 to 8 s before seizure termination. This study confirmed that adenosine may play a prominent role in seizure termination and extended previous microdialysis studies showing an increase in adenosine levels within minutes of epileptic seizure. The high temporal resolution allowed by electrochemical techniques and microelectrode biosensors allowed researchers to tightly correlate increases in adenosine to the last seconds of epileptic seizure, which represented a major advance in our understanding of epilepsy (Van Gompel *et al.*, 2014).

Overall, microelectrode biosensors provide an important methodological breakthrough to investigate the neuronal mechanisms of epileptic seizures on a second-by-second basis.

16.6.2 Ischemia and stroke models

Brain ischemia results from a critical reduction in CBF that reduces the supply of oxygen and energy metabolites below the threshold necessary for cell survival. It is a recognized and common cause of irreversible brain damage (Raichle, 1983). Brain ischemia can be global, for example during cardiac arrest, or local, such as

when a blood vessel is occluded in stroke patients. Ischemia can also be induced by SAH, when a major blood vessel bleeds, as in cases of ruptured aneurysm. Several animal models are available to study the mechanisms of ischemic brain injury *in vivo*. One of the most widely used models is occlusion of the middle cerebral artery (MCAO), a major blood vessel that provides blood supply to the whole anterior hemisphere. Five minutes of MCAO is sufficient to induce infarction and severe neurological deficits in rats but the precise mechanisms responsible for neuronal injury remain to be understood (Bederson *et al.*, 1986).

As in epilepsy research, the role of free radicals and reactive oxygen and nitrogen species in infarct formation is a subject of intense research. Malinski and colleagues succeeded in implanting an NO sensor (carbon fiber microelectrodes covered with a metallo-porphyrin and a screening layer of Nafion) in the brain of rats subjected to 2 h MCAO. They could monitor NO levels during the ischemic phase as well as during reperfusion and detected a large NO release peaking around 3 μM during ischemia, but not reperfusion (Malinski *et al.*, 1993). In a brain slice model, Ganesana monitored the formation of superoxide using biosensors based on gold wires covered with cytochrome *c*. When the slice was deprived of oxygen and glucose, superoxide production was doubled (Ganesana *et al.*, 2012). Overall, these studies indicate that free radicals are indeed released in response to ischemia and that they are likely to induce oxidative stress in neuronal cells and to contribute to infarct formation in the ischemic brain.

16.6.3 Traumatic brain injury (TBI)

TBI encompasses all alterations in brain function caused by an external force (Menon *et al.*, 2010). With an average incidence of about 262/100,000 inhabitants per year in Europe, TBI often affects young individuals and represents the primary cause of disability below age 45 (Tagliaferri *et al.*, 2006; Peeters *et al.*, 2015). The economic cost of TBI is immense, but remains difficult to estimate because it involves both direct costs of treatment, rehabilitation, and long-term assistance, but also the much higher indirect costs of productivity loss for patients, relatives, and society (Langlois *et al.*, 2006; Kayani *et al.*, 2009). In addition, there is often a long delay between the initial insult and the onset of neurological and cognitive deficits, even after mild or moderate TBI (Peeters *et al.*, 2015).

From a neurobiological point of view, TBI produces an initial insult via tissue compression or shearing. These primary lesions are later followed by a sequence of secondary complications that take place in the hours to days following the trauma. Such complications include marked hypoperfusion in surrounding areas of the brain, sometimes referred to as traumatic penumbra (von Oettingen *et al.*, 2002). In a recent study, Balança *et al.* induced moderate and severe TBI to rats using a

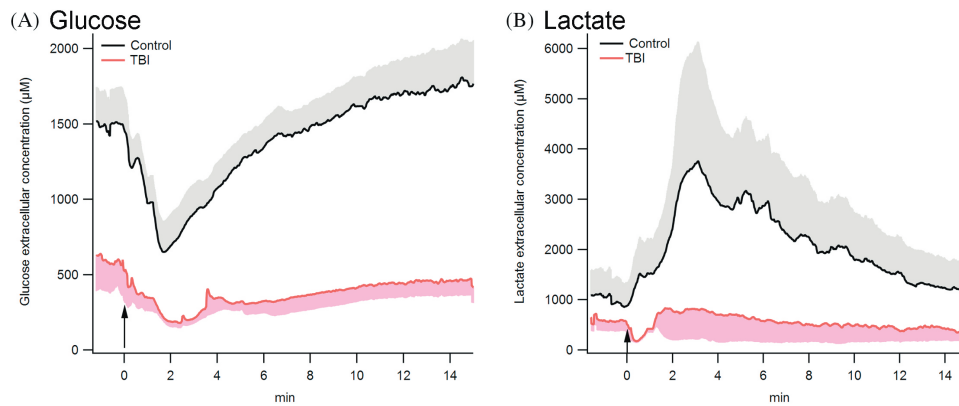


Figure 16.4 Changes in glucose (A) and lactate extracellular concentrations (B) in response to cortical spreading depolarizations evoked by KCl in control rats or spontaneously after severe traumatic brain injury (TBI). In TBI rats, brain metabolic disturbances are characterized by a decreased glucose basal concentration and a lack of lactate release evoked by spreading depolarization. Data are expressed as mean \pm SEM (shading).

lateral fluid percussion model, in which a shockwave is applied to the dura through a small craniotomy. They observed a reproducible penumbra area encompassing the temporal cortex, area CA3 of the hippocampus, and the dorsal thalamus (Balança *et al.*, 2016). Using implanted enzyme microelectrode biosensors in penumbral region to monitor glucose and lactate extracellular concentration, as well as PbtO_2 , they detected a persistently decreased glucose concentration that accompanied a drop in local brain perfusion (Figure 16.4A).

Glutamate microelectrode biosensors have also been implanted in the rat brain after mild or moderate TBI. Although glutamate basal levels were unchanged in frontal cortex, they were almost doubled in hippocampus and striatum two days after TBI (Hinzman *et al.*, 2010). Moreover, the increase in tonic glutamate in striatum depended on glial glutamate release as well as impaired glutamate reuptake (Hinzman *et al.*, 2012). These changes in glutamate neurotransmission after TBI could contribute to ongoing development of excitotoxic insult and neurological lesions over time.

16.6.4 Spreading depolarizations

Spreading depolarizations (SDs) represent an interesting feature of brain injury. They are waves of abrupt, sustained, near-complete breakdown of cellular transmembrane ion gradients that travel through the cortex at a speed of 2–4 mm/min (Somjen, 2001; Dreier, 2011; Lauritzen *et al.*, 2011; Balança *et al.*, 2017). SDs induce a massive, transient depolarization of brain cells and are observed in 56% of patients with severe TBI (Fabricius *et al.*, 2006; Hartings *et al.*, 2011b), 60–70%

of patients with intracerebral hemorrhage (Lauritzen *et al.*, 2011), 70–80% of patients with poor-grade aneurysmal SAH (Dreier *et al.*, 2006, 2012), and nearly all patients with malignant hemispheric stroke (Dohmen *et al.*, 2008; Woitzik *et al.*, 2013). In neurointensive care, SDs are considered to be markers of severe injury and poor prognosis (Dreier *et al.*, 2006; Hartings *et al.*, 2011a; Dreier and Reiffurth, 2015), correlated with cytotoxic oedema and new injuries (Dreier *et al.*, 2018).

The biochemical mechanisms responsible for SD induction in the injured brain are largely unknown. It is possible that SDs result from acute increases in neuronal excitability and/or a mismatch between high energy demand and low supply, such as in the peri-infarct zones in stroke models (Dreier *et al.*, 2002; von Bornstadt *et al.*, 2015). It is thought that SDs can also occur in healthy individuals, in which they are rather innocuous (e.g. during migraine aura), whereas they can aggravate neuronal injury in the already injured brain (Dreier and Reiffurth, 2015). For example, in healthy individuals, SDs induce a wave of hyperemia through neurovascular coupling mechanisms. It is hypothesized that in brain injured patients, neurovascular coupling mechanisms are impaired and thus SDs induce a spreading ischemia that can aggravate brain injury (Dreier, 2011).

SDs have been studied using microelectrode biosensors in both stroke and TBI models. Hinzman *et al.* implanted glutamate microelectrode biosensors in the ischemic core and penumbra in a rat MCAO model. They detected a transient increase in glutamate extracellular concentration for each spontaneous SD. Glutamate peaked around 6–12 μM and the increase lasted about 2–3 min, significantly longer than in healthy animals. Such prolonged elevation in glutamate extracellular level might underlie the mechanism for excitotoxic damage in the penumbral zone of stroke (Hinzman *et al.*, 2015).

Using a similar approach, Balança *et al.* (2017) studied the metabolic profile of spontaneous SDs observed a few hours after severe TBI in rats. They detected a hypermetabolic response to SDs in healthy rats, characterized by a drop in glucose extracellular concentration and a large increase in lactate levels. Interestingly, this hypermetabolic pattern was not observed in rats with severe TBI, in which lactate failed to increase in response to SD (Figure 16.4). The loss of this lactate response to SDs might reflect an early metabolic disturbance in brain injured rats that could be partially responsible for the delayed development of neurological lesions (Balança *et al.*, 2017).

The neurochemical monitoring of SDs has also provided an opportunity to compare the *in vivo* performance of microelectrode biosensors to that of microdialysis probes. Microdialysis probes are usually much larger than microelectrode biosensors. Their diameter ranges between 200 and 500 μm whereas microelectrode biosensors can be as small as 40–50 μm in diameter (Chatard *et al.*, 2018). Consequently, brain microdialysis probes are typically surrounded by

compromised tissue, as evidenced by electron microscopic studies that observed neuronal cell death up to 400 μm away from the probe, and tissue disruption including swollen axons and degenerating cell bodies up to 1.2 mm (Clapp-Lilly *et al.*, 1999). To better understand the local effects of microdialysis probe implantation, Borland *et al.* detected dopamine release near a microdialysis probe with an external diameter of 220 μm with a carbon fiber microelectrode just 7 μm in diameter. Although the carbon fiber microelectrode detected a large dopamine release in response to neuronal stimulation in healthy tissue, dopamine release was no longer detected near the microdialysis probe (Borland *et al.*, 2005; Wintermark *et al.*, 2005). These data indicate that microdialysis probes can disrupt local neuronal transmission, probably in response to tissue lesions during implantation.

SD neurochemical monitoring confirms this notion. In healthy animals, microelectrode biosensors revealed a large hypermetabolic response to SDs during which glucose levels decreased by 70–80% and lactate increased by 60–100% (Balança *et al.*, 2017; Lourenco *et al.*, 2017). Microdialysis can also detect neurochemical changes in response to SDs, provided that it is performed at high temporal resolution (Rogers *et al.*, 2013; Varner *et al.*, 2017; Gowers *et al.*, 2018). Interestingly, the dynamic changes in glucose and lactate appear dampened when measured with this technique (Figure 16.5). The decrease in glucose levels was only 10–20% (Rogers *et al.*, 2013; Varner *et al.*, 2017), while the increase in lactate extracellular

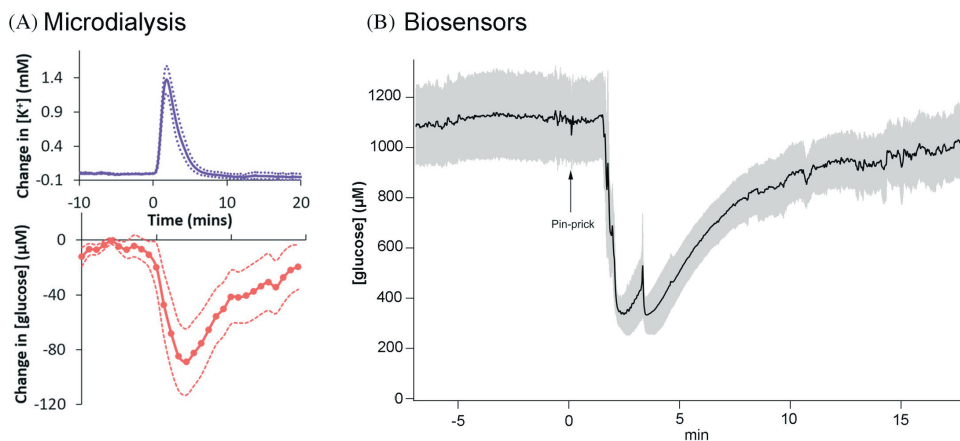


Figure 16.5 Changes in glucose extracellular concentration in response to a cortical spreading depolarization (SD). (A) Glucose changes monitored using continuous online microdialysis enhanced by local infusion of dexamethasone (reproduced with permission from Varner *et al.*, 2017). Top trace represents potassium concentration changes; bottom trace represents glucose. (B) Glucose changes monitored with microelectrode biosensors. Data are expressed as mean \pm SEM. Microdialysis detected a change in glucose concentration of about $-100 \mu\text{M}$, which represents a 30–35% decrease from baseline, whereas with microelectrode biosensors, glucose dropped from 1.1 mM to 0.3 mM (–73 %). This comparison suggests that microelectrode biosensors are more sensitive to rapid changes in concentrations, probably due to the absence of a layer of compromised tissue acting as a low-pass filter.

concentration was 30% (Rogers *et al.*, 2013). It should be noted, however, that in brain injured patients the drop in glucose extracellular level evoked by SDs can be much larger (Feuerstein *et al.*, 2010; Hutchinson *et al.*, 2014; Rogers *et al.*, 2017). This comparison supports the view that microdialysis probes measure from a local microenvironment of compromised brain tissue that acts as a low-pass filter on dynamic concentration changes spontaneously occurring in the brain. Because of their smaller size, microelectrode biosensors have the potential to diminish the extent of brain tissue lesion around the site of probe implantation and, therefore, to gather more sensitive and more reliable data to understand brain neurochemistry.

16.7 Conclusion

Microelectrode biosensors represent a promising methodology for improved neurochemical monitoring of the injured brain. Their main advantages are (1) their excellent second-by-second time resolution, and (2) their potential for miniaturization to diameters of a few micrometers. These advantages could open new opportunities for recording neurochemical changes related to neurological lesion development after injury with improved sensitivity and temporal resolution. Although these devices are not yet approved for clinical use, it is likely that they will be in the future and become part of multimodal monitoring technologies in brain-injured patients.

Acknowledgments

CA is the recipient of a doctoral fellowship by Région Auvergne-Rhône-Alpes. This study was supported by Fondation Gueules Cassées "Sourire Quand Même" (grants FGC49-2016 and FGC34-2018), CNRS mission à l'interdisciplinarité, and Agence Nationale pour la Recherche (PALSE project ANR-11-IDEX-0007-02). BB is the recipient of a CCA Inserm-Bettencourt fellowship. CA, AM, and SM are supported by Inserm U1028, CNRS UMR5292, and University of Lyon.

References

- Arima J, Tamura T, Kusakabe H, Ashiuchi M, Yagi T, Tanaka H, Inagaki K (2003) Recombinant expression, biochemical characterization and stabilization through proteolysis of an L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X-119-6. *J Biochem*, 134: 805–812.
- Balança B, Baptiste L, Lieutaud T, Ressnikoff D, Guy R, Bezin L, Marinesco S (2016) Neuronal loss as evidenced by automated quantification of neuronal density following moderate and severe traumatic brain injury in rats. *J Neurosci Res*, 94: 39–49.

352 C. Allieux et al.

- Balança B, Dailler F, Boulogne S, Ritzenthaler T, Gobert F, Rheims S, Andre-Obadia N (2018) Diagnostic accuracy of quantitative EEG to detect delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage: A preliminary study. *Clin Neurophysiol*, 129: 1926–1936.
- Balança B, Meiller A, Bezin L, Dreier JP, Marinesco S, Lieutaud T (2017) Altered hypermetabolic response to cortical spreading depolarizations after traumatic brain injury in rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism. J Cereb Blood Flow Metab*, 37: 1670–1686.
- Barcelos GK, Tholance Y, Grousseau S, Renaud B, Perret-Liaudet A, Dailler F, Zimmer L (2013) Outcome of poor-grade subarachnoid hemorrhage as determined by biomarkers of glucose cerebral metabolism. *Neurocrit Care*, 18: 234–244.
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H (1986) Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 17: 472–476.
- Belay A, Collins A, Ruzgas T, Kissinger PT, Gorton L, Csoregi E (1999) Redox hydrogel based bienzyme electrode for L-glutamate monitoring. *J Pharm Biomed Anal*, 19: 93–105.
- Bilgin S, Guclu-Gunduz A, Oruckaptan H, Kose N, Celik B (2012) Gait and Glasgow Coma Scale scores can predict functional recovery in patients with traumatic brain injury. *Neural Regen Res*, 7: 1978–1984.
- Bindra DS, Zhang Y, Wilson GS, Sternberg R, Thévenot DR, Moatti D, Reach G (1991) Design and *in vitro* studies of a needle-type glucose sensor for subcutaneous monitoring. *Anal Chem*, 63: 1692–1696.
- Bolger FB, Lowry JP (2005) Brain tissue oxygen: *In vivo* monitoring with carbon paste electrodes. *Sensors*, 5: 473–487.
- Bollella P, Gorton L, Antiochia R (2018) Direct electron transfer of dehydrogenases for development of 3rd Generation biosensors and enzymatic fuel cells. *Sensors*, 18: Pii:E1316.
- Booth MA, Gowers SAN, Leong CL, Rogers ML, Samper IC, Wickham AP, Boutelle MG (2018) Chemical monitoring in clinical settings: Recent developments toward real-time chemical monitoring of patients. *Anal Chem*, 90: 2–18.
- Borgmann S, Schulte A, Neugebauer S, Schuhmann W (2012) Amperometric Biosensors, In *Advances in Electrochemical Science and Engineering*, Vol. 13 (Alkire RC, Kolb DM, Lipkowski J, eds.)
- Borland LM, Shi G, Yang H, Michael AC (2005) Voltammetric study of extracellular dopamine near microdialysis probes acutely implanted in the striatum of the anesthetized rat. *J Neurosci Methods*, 146: 149–158.
- Botteri M, Bandera E, Minelli C, Latronico N (2008) Cerebral blood flow thresholds for cerebral ischemia in traumatic brain injury. A systematic review. *Crit Care Med*, 36: 3089–3092.
- Bouzat P, Marques-Vidal P, Zerlauth JB, Sala N, Suys T, Schoettker P, Bloch J, Daniel RT, Levivier M, Meuli R, Oddo M (2015) Accuracy of brain multimodal monitoring to detect cerebral hypoperfusion after traumatic brain injury. *Crit Care Med*, 43: 445–452.

- Bratton SL, Chestnut RM, Ghajar J, McConnell Hammond FF, Harris OA, Hartl R, Manley GT, Nemecek A, Newell DW, Rosenthal G, Schouten J, Shutter L, Timmons SD, Ullman JS, Videtta W, Wilberger JE, Wright DW (2007) Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. VIII. Intracranial pressure thresholds. *J Neurotrauma*, 24 Suppl 1: S55–58.
- Bungay PM, Newton-Vinson P, Isele W, Garris PA, Justice JB (2003) Microdialysis of dopamine interpreted with quantitative model incorporating probe implantation trauma. *J Neurochem*, 86: 932–946.
- Burmeister JJ, Davis VA, Quintero JE, Pomerleau F, Huettl P, Gerhardt GA (2013) Glutaraldehyde cross-linked glutamate oxidase coated microelectrode arrays: Selectivity and resting levels of glutamate in the CNS. *ACS Chem Neurosci*, 4: 721–728.
- Burmeister JJ, Gerhardt GA (2001) Self-referencing ceramic-based multisite microelectrodes for the detection and elimination of interferences from the measurement of L-glutamate and other analytes. *Anal Chem*, 73: 1037–1042.
- Burmeister JJ, Moxon K, Gerhardt GA (2000) Ceramic-based multisite microelectrodes for electrochemical recordings. *Anal Chem*, 72: 187–192.
- Burmeister JJ, Pomerleau F, Huettl P, Gash CR, Werner CE, Bruno JP, Gerhardt GA (2008) Ceramic-based multisite microelectrode arrays for simultaneous measures of choline and acetylcholine in CNS. *Biosens Bioelectron*, 23: 1382–1389.
- Carpenter KL, Young AM, Hutchinson PJ (2017) Advanced monitoring in traumatic brain injury: Microdialysis. *Curr Op Crit Care*, 23: 103–109.
- Cavalheiro EA (1995) The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci*, 16: 33–37.
- Chatard C, Meiller A, Marinesco S (2018) Microelectrode biosensors for in vivo analysis of brain interstitial fluid. *Electroanalysis*, 30: 977–998.
- Chefer VI, Thompson AC, Zapata A, Shippenberg TS (2001) Overview of brain microdialysis. *Curr Protoc Neurosci*, 47: 7.1.1–7.1.28.
- Chestnut RM, Temkin N, Carney N, Dikmen S, Rondina C, Videtta W, Petroni G, Lujan S, Pridgeon J, Barber J, Machamer J, Chaddock K, Celix JM, Cherner M, Hendrix T (2012) Global neurotrauma research. A trial of intracranial-pressure monitoring in traumatic brain injury. *New Engl J Med*, 367: 2471–2481.
- Claassen J, Hirsch LJ, Frontera JA, Fernandez A, Schmidt M, Kapinos G, Wittman J, Connolly ES, Emerson RG, Mayer SA (2006) Prognostic significance of continuous EEG monitoring in patients with poor-grade subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care*, 4: 103–112.
- Clapp-Lilly KL, Roberts RC, Duffy LK, Irons KP, Hu Y, Drew KL (1999) An ultrastructural analysis of tissue surrounding a microdialysis probe. *J Neurosci Methods*, 90: 129–142.
- Clark LC, Lyons C (1962) Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annal New York Acad Sci*, 102: 29–45.
- Cosnier S (1999) Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review. *Biosens Bioelectron*, 14: 443–456.

- Cunningham AS, Salvador R, Coles JP, Chatfield DA, Bradley PG, Johnston AJ, Steiner LA, Fryer TD, Aigbirhio FI, Smielewski P, Williams GB, Carpenter TA, Gillard JH, Pickard JD, Menon DK (2005) Physiological thresholds for irreversible tissue damage in contusional regions following traumatic brain injury. *Brain*, 128: 1931–1942.
- Davies DJ, Su Z, Clancy MT, Lucas SJ, Dehghani H, Logan A, Belli A (2015) Near-infrared spectroscopy in the monitoring of adult traumatic brain injury: A review. *J Neurotrauma*, 32: 933–941.
- De Georgia MA (2015) Brain tissue oxygen monitoring in neurocritical care. *J Intensive Care Med*, 30: 473–483.
- Dohmen C, Sakowitz OW, Fabricius M, Bosche B, Reithmeier T, Ernestus RI, Brinker G, Dreier JP, Woitzik J, Strong AJ, Graf R, Co-Operative Study of Brain Injury D (2008) Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence. *Ann Neurol*, 63: 720–728.
- Dreier JP (2011) The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nature Med*, 17: 439–447.
- Dreier JP, Kleeberg J, Petzold G, Priller J, Windmuller O, Orzechowski HD, Lindauer U, Heinemann U, Einhaupl KM, Dirnagl U (2002) Endothelin-1 potently induces Leao's cortical spreading depression in vivo in the rat: A model for an endothelial trigger of migrainous aura? *Brain*, 125: 102–112.
- Dreier JP, Lemale CL, Kola V, Friedman A, Schoknecht K (2018) Spreading depolarization is not an epiphenomenon but the principal mechanism of the cytotoxic edema in various gray matter structures of the brain during stroke. *Neuropharm*, 134: 189–207.
- Dreier JP, Major S, Manning A, Woitzik J, Drenckhahn C, Steinbrink J, Tolia C, Oliveira-Ferreira AI, Fabricius M, Hartings JA, Vajkoczy P, Lauritzen M, Dirnagl U, Bohner G, Strong AJ (2009) Cortical spreading ischaemia is a novel process involved in ischaemic damage in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Brain*, 132: 1866–1881.
- Dreier JP, Major S, Pannek HW, Woitzik J, Scheel M, Wiesenthal D, Martus P, Winkler MK, Hartings JA, Fabricius M, Speckmann EJ, Gorji A, group Cs (2012) Spreading convulsions, spreading depolarization and epileptogenesis in human cerebral cortex. *Brain*, 135: 259–275.
- Dreier JP, Reiffurth C (2015) The stroke-migraine depolarization continuum. *Neuron*, 86: 902–922.
- Dreier JP, Woitzik J, Fabricius M, Bhatia R, Major S, Drenckhahn C, Lehmann TN, Sarrafzadeh A, Willumsen L, Hartings JA, Sakowitz OW, Seemann JH, Thieme A, Lauritzen M, Strong AJ (2006) Delayed ischaemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depolarizations. *Brain*, 129: 3224–3237.
- During MJ, Spencer DD (1993) Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet*, 341: 1607–1610.
- Enroth C, Eger BT, Okamoto K, Nishino T, Nishino T, Pai EF (2000) Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 10723–10728.

- Euser SM, Hofman A, Westendorp RG, Breteler MM (2009) Serum uric acid and cognitive function and dementia. *Brain*, 132: 377–382.
- Fabricsius M, Fuhr S, Bhatia R, Boutelle M, Hashemi P, Strong AJ, Lauritzen M (2006) Cortical spreading depression and peri-infarct depolarization in acutely injured human cerebral cortex. *Brain*, 129: 778–790.
- Feuerstein D, Manning A, Hashemi P, Bhatia R, Fabricsius M, Tolia C, Pahl C, Ervine M, Strong AJ, Boutelle MG (2010) Dynamic metabolic response to multiple spreading depolarizations in patients with acute brain injury: An online microdialysis study. *J Cereb Blood Flow Metab*, 30: 1343–1355.
- Foulds NC, Lowe CR (1986) Enzyme entrapment in electrically conducting polymers — immobilization of glucose-oxidase in polypyrrole and its application in amperometric glucose sensors. *J Chem Soc Farad*, T 82: 1259–1264.
- Frew JE, Hill HA (1988) Direct and indirect electron transfer between electrodes and redox proteins. *Eur J Biochem*, 172: 261–269.
- Frey O, van der Wal P, de Rooij N, Koudelka-Hep M (2007) Development and characterization of choline and L-glutamate biosensor integrated on silicon microprobes for *in-vivo* monitoring. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2007: 6040–6043.
- Frey O, Holtzman T, McNamara RM, Theobald DE, van der Wal PD, de Rooij NF, Dalley JW, Koudelka-Hep M (2010) Enzyme-based choline and L-glutamate biosensor electrodes on silicon microprobe arrays. *Biosens Bioelectron*, 26: 477–484.
- Ganesana M, Erlichman JS, Andreescu S (2012) Real-time monitoring of superoxide accumulation and antioxidant activity in a brain slice model using an electrochemical cytochrome *c* biosensor. *Free Radic Biol Med*, 53: 2240–2249.
- Gerhardt GA, Oke AF, Nagy G, Moghaddam B, Adams RN (1984) Nafion-coated electrodes with high selectivity for CNS electrochemistry. *Brain Res*, 290: 390–395.
- Gonon F, Buda M, Cespuglio R, Jouvét M, Pujol JF (1980) *In vivo* electrochemical detection of catechols in the neostriatum of anaesthetized rats: Dopamine or DOPAC? *Nature*, 286: 902–904.
- Gowers SAN, Hamaoui K, Cunnea P, Anastasova S, Curto VF, Vadgama P, Yang GZ, Papalois V, Drakakis EM, Fotopoulou C, Weber SG, Boutelle MG (2018) High temporal resolution delayed analysis of clinical microdialysate streams. *Analyst*, 143: 715–724.
- Grasso G, Alafaci C, Macdonald RL (2017) Management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: State of the art and future perspectives. *Surg Neurol Int*, 8: 11.
- Gregg BA, Heller A (1991) Redox polymer films containing enzymes. 1. A redox-conducting epoxy cement: Synthesis, characterization, and electrocatalytic oxidation of hydroquinone. *J Phys Chem*, 95: 5970–5975.
- Griffiths JR, Robinson SP (1999) The OxyLite: A fibre-optic oxygen sensor. *Br J Radiol*, 72: 627–630.
- Guiza F, Depreitere B, Piper I, Citerio G, Chambers I, Jones PA, Lo TY, Enblad P, Nillson P, Feyen B, Jorens P, Maas A, Schuhmann MU, Donald R, Moss L, Van den Berghe G, Meyfroidt G (2015) Visualizing the pressure and time burden of intracranial

- hypertension in adult and paediatric traumatic brain injury. *Intensive Care Med*, 41: 1067–1076.
- Hall SB, Khudaish EA, Hart AL (1999) Electrochemical oxidation of hydrogen peroxide at platinum electrodes. Part III: Effect of temperature. *Electrochim Acta*, 44: 2455–2462.
- Hamdan SK, Mohd Zain A (2014) *In vivo* electrochemical biosensor for brain glutamate detection: A mini review. *Malays J Med Sci*, 21: 12–26.
- Hartings JA, Bullock MR, Okonkwo DO, Murray LS, Murray GD, Fabricius M, Maas AI, Woitzik J, Sakowitz O, Mathern B, Roozenbeek B, Lingsma H, Dreier JP, Puccio AM, Shutter LA, Pahl C, Strong AJ (2011b) Spreading depolarisations and outcome after traumatic brain injury: A prospective observational study. *Lancet Neurol*, 10: 1058–1064.
- Hartings JA, Watanabe T, Bullock MR, Okonkwo DO, Fabricius M, Woitzik J, Dreier JP, Puccio A, Shutter LA, Pahl C, Strong AJ (2011a) Spreading depolarizations have prolonged direct current shifts and are associated with poor outcome in brain trauma. *Brain*, 134: 1529–1540.
- Hebb MO, McArthur DL, Alger J, Etchepare M, Glenn TC, Bergsneider M, Martin N, Vespa PM (2007) Impaired percent alpha variability on continuous electroencephalography is associated with thalamic injury and predicts poor long-term outcome after human traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 24: 579–590.
- Heller A (2006) Electron-conducting redox hydrogels: Design, characteristics and synthesis. *Curr Opin Chem Biol*, 10: 664–672.
- Heller A, Feldman B (2008) Electrochemical glucose sensors and their applications in diabetes management. *Chem Rev*, 108: 2482–2505.
- Hinzman JM, DiNapoli VA, Mahoney EJ, Gerhardt GA, Hartings JA (2015) Spreading depolarizations mediate excitotoxicity in the development of acute cortical lesions. *Exp Neurol*, 267: 243–253.
- Hinzman JM, Thomas TC, Burmeister JJ, Quintero JE, Huettl P, Pomerleau F, Gerhardt GA, Lifshitz J (2010) Diffuse brain injury elevates tonic glutamate levels and potassium-evoked glutamate release in discrete brain regions at two days post-injury: An enzyme-based microelectrode array study. *J Neurotrauma*, 27: 889–899.
- Hinzman JM, Thomas TC, Quintero JE, Gerhardt GA, Lifshitz J (2012) Disruptions in the regulation of extracellular glutamate by neurons and glia in the rat striatum two days after diffuse brain injury. *J Neurotrauma*, 29: 1197–1208.
- Hu Y, Wilson GS (1997) A temporary local energy pool coupled to neuronal activity: Fluctuations of extracellular lactate levels in rat brain monitored with rapid-response enzyme-based sensor. *J Neurochem*, 69: 1484–1490.
- Hu Y, Wilson GS (1997) Rapid changes in local extracellular rat brain glucose observed with an *in vivo* glucose sensor. *J Neurochem*, 68: 1745–1752.
- Hutchinson P, O'Phelan K et al. (2014) International multidisciplinary consensus conference on multimodality monitoring: Cerebral metabolism. *Neurocrit Care*, 21 Suppl 2: S148–158.
- Jordan KG (2004) Emergency EEG and continuous EEG monitoring in acute ischemic stroke. *J Clin Neurophysiol*, 21: 341–352.

- Karyakin AA, Gitelmacher OV, Karyakina EE (1995) Prussian blue based first-generation biosensor — a sensitive amperometric electrode for glucose. *Anal Chem*, 67: 2419–2423.
- Karyakin AA, Karyakina EE, Gorton L (2000) Amperometric biosensor for glutamate using Prussian blue-based “artificial peroxidase” as a transducer for hydrogen peroxide. *Anal Chem*, 72: 1720–1723.
- Katsounaros I, Schneider WB, Meier JC, Benedikt U, Biedermann PU, Auer AA, Mayrhofer KJ (2012) Hydrogen peroxide electrochemistry on platinum: Towards understanding the oxygen reduction reaction mechanism. *Phys Chem Chem Phys*, 14: 7384–7391.
- Kaura S, Bradford HF, Young AMJ, Croucher MJ, Hughes PD (1995) Effect of amygdaloid kindling on the content and release of amino acids from the amygdaloid complex: *In vivo* and *in vitro* studies. *J Neurochem*, 65: 1240–1249.
- Kawagoe KT, Jankowski JA, Wightman RM (1991) Etched carbon-fiber electrodes as amperometric detectors of catecholamine secretion from isolated biological cells. *Anal Chem*, 63: 1589–1594.
- Kayani NA, Homan S, Yun S, Zhu BP (2009) Health and economic burden of traumatic brain injury: Missouri, 2001–2005. *Public Health Rep*, 124: 551–560.
- Keilin D, Hartree EF (1952) Specificity of glucose oxidase (notatin). *Biochem J*, 50: 331–341.
- Khan GM, Smolders I, Lindekens H, Manil J, Ebinger G, Michotte Y (1999) Effects of diazepam on extracellular brain neurotransmitters in pilocarpine-induced seizures in rats. *Eur J Pharmacol*, 373: 153–161.
- Korbakis G, Vespa PM (2017) Multimodal neurologic monitoring. *Handb Clinical Neurol*, 140: 91–105.
- Kulagina NV, Shankar L, Michael AC (1999) Monitoring glutamate and ascorbate in the extracellular space of brain tissue with electrochemical microsensors. *Anal Chem*, 71: 5093–5100.
- Kurtz P, Hanafy KA, Claassen J (2009) Continuous EEG monitoring: Is it ready for prime time? *Curr Op Crit Care*, 15: 99–109.
- Langlois JA, Rutland-Brown W, Wald MM (2006) The epidemiology and impact of traumatic brain injury: A brief overview. *J Head Trauma Rehab*, 21: 375–378.
- Lauritzen M, Dreier JP, Fabricius M, Hartings JA, Graf R, Strong AJ (2011) Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: Migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31: 17–35.
- Le Roux P *et al.* (2014) The International Multidisciplinary Consensus Conference on Multimodality Monitoring in Neurocritical Care: Evidentiary tables: A statement for healthcare professionals from the Neurocritical Care Society and the European Society of Intensive Care Medicine. *Neurocrit Care*, 21 Suppl 2: S297–361.
- Lee I, Loew N, Tsugawa W, Lin CE, Probst D, La Belle JT, Sode K (2018) The electrochemical behavior of a FAD dependent glucose dehydrogenase with direct electron transfer subunit by immobilization on self-assembled monolayers. *Bioelectrochem*, 121: 1–6.

358 C. Allieux et al.

- Lietsche J, Gorka J, Hardt S, Karas M, Klein J (2015) Custom-made microdialysis probe design. *JoVE*: e53048.
- Lindgren A, Ruzgas T, Gorton L, Csoregi E, Ardila GB, Sakharov IY, Gazaryan IG (2000) Biosensors based on novel peroxidases with improved properties in direct and mediated electron transfer. *Biosens Bioelectron*, 15: 491–497.
- Llaudet E, Botting NP, Crayston JA, Dale N (2003) A three-enzyme microelectrode sensor for detecting purine release from central nervous system. *Biosens Bioelectron*, 18: 43–52.
- Lourenco CF, Ledo A, Gerhardt GA, Laranjinha J, Barbosa RM (2017) Neurometabolic and electrophysiological changes during cortical spreading depolarization: Multimodal approach based on a lactate-glucose dual microbiosensor arrays. *Sci Rep*, 7: 6764.
- Lowenstein DH, Bleck T, Macdonald RL (1999) It's time to revise the definition of status epilepticus. *Epilepsia*, 40: 120–122.
- Lowry JP, Boutelle MG, Fillenz M (1997) Measurement of brain tissue oxygen at a carbon past electrode can serve as an index of increases in regional cerebral blood flow. *J Neurosci Methods*, 71: 177–182.
- Lowry JP, O'Neill RD (1994) Partial characterization in-vitro of glucose oxidase-modified poly(phenylenediamine)-coated electrodes for neurochemical analysis *in-vivo*. *Electroanalysis*, 6: 369–379.
- Lugo-Morales LZ, Loziuk PL, Corder AK, Toups JV, Roberts JG, McCaffrey KA, Sombers LA (2013) Enzyme-modified carbon-fiber microelectrode for the quantification of dynamic fluctuations of nonelectroactive analytes using fast-scan cyclic voltammetry. *Anal Chem*, 85: 8780–8786.
- Malinski T, Bailey F, Zhang ZG, Chopp M (1993) Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 13: 355–358.
- Malitesta C, Palmisano F, Torsi L, Zamboni PG (1990) Glucose fast-response amperometric sensor based on glucose oxidase immobilized in an electropolymerized poly(o-phenylenediamine) film. *Anal Chem*, 62: 2735–2740.
- Maucler C, Pernot P, Vasylieva N, Pollegioni L, Marinesco S (2013) In vivo D-serine hetero-exchange through alanine-serine-cysteine (ASC) transporters detected by microelectrode biosensors. *ACS Chem Neurosci*, 4: 772–781.
- McMahon CJ, Hopkins S, Vail A, King AT, Smith D, Illingworth KJ, Clark S, Rothwell NJ, Tyrrell PJ (2013) Inflammation as a predictor for delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *J Neurointerv Surg*, 5: 512–517.
- McMahon CP, O'Neill RD (2005) Polymer-enzyme composite biosensor with high glutamate sensitivity and low oxygen dependence. *Anal Chem*, 77: 1196–1199.
- Menon DK, Schwab K, Wright DW, Maas AI (2010) Position statement: Definition of traumatic brain injury. *Arch Phys Med and Rehabil*, 91: 1637–1640.
- Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A (2013) Sugar for the brain: The role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci*, 36: 587–597.
- Meunier CJ, Mitchell EC, Roberts JG, Toups JV, McCarty GS, Sombers LA (2018) Electrochemical selectivity achieved using a double voltammetric waveform and partial

- least squares regression: Differentiating endogenous hydrogen peroxide fluctuations from shifts in pH. *Anal Chem*, 90: 1767–1776.
- Miele M, Fillenz M (1996) *In vivo* determination of extracellular brain ascorbate. *J Neurosci Methods*, 70: 15–19.
- Moon J, Ha Y, Kim M, Sim J, Lee Y, Suh M (2016) Dual electrochemical microsensor for real-time simultaneous monitoring of nitric oxide and potassium ion changes in a rat brain during spontaneous neocortical epileptic seizure. *Anal Chem*, 88: 8942–8948.
- Morales-Villagran A, Medina-Ceja L, Lopez-Perez SJ (2008) Simultaneous glutamate and EEG activity measurements during seizures in rat hippocampal region with the use of an electrochemical biosensor. *J Neurosci Methods*, 168: 48–53.
- Naylor E, Aillon DV, Barrett BS, Wilson GS, Johnson DA, Harmon HP, Gabbert S, Petillo PA (2012) Lactate as a biomarker for sleep. *Sleep*, 35: 1209–1222.
- Netchiporouk LI, Shulga AA, Jaffrezicrenault N, Martelet C, Olier R, Cespuglio R (1995) Properties of carbon-fiber microelectrodes as a basis for enzyme biosensors. *Anal Chim Acta*, 303: 275–283.
- O'Neill RD, Chang SC, Lowry JP, McNeil CJ (2004) Comparisons of platinum, gold, palladium and glassy carbon as electrode materials in the design of biosensors for glutamate. *Biosens Bioelectron*, 19: 1521–1528.
- Ohara TJ, Rajagopalan R, Heller A (1993) Glucose electrodes based on cross-linked [Os(bpy)₂Cl]⁺²⁺ complexed poly(1-vinylimidazole) films. *Anal Chem*, 65: 3512–3517.
- Ohara TJ, Rajagopalan R, Heller A (1994) "Wired" enzyme electrodes for amperometric determination of glucose or lactate in the presence of interfering substances. *Anal Chem*, 66: 2451–2457.
- Okonkwo DO, Shutter LA, Moore C, Temkin NR, Puccio AM, Madden CJ, Andaluz N, Chesnut RM, Bullock MR, Grant GA, McGregor J, Weaver M, Jallo J, LeRoux PD, Moberg D, Barber J, Lazaridis C, Diaz-Arrastia RR (2017) Brain oxygen optimization in severe traumatic brain injury Phase-II: A Phase II randomized trial. *Crit Care Med*, 45: 1907–1914.
- Oldenzien WH, Dijkstra G, Cremers TI, Westerink BH (2006a) Evaluation of hydrogel-coated glutamate microsensors. *Anal Chem*, 78: 3366–3378.
- Oldenzien WH, Dijkstra G, Cremers TI, Westerink BH (2006b) *In vivo* monitoring of extracellular glutamate in the brain with a microsensor. *Brain Res*, 1118: 34–42.
- Oldenzien WH, Westerink BH (2005) Improving glutamate microsensors by optimizing the composition of the redox hydrogel. *Anal Chem*, 77: 5520–5528.
- Otite F, Mink S, Tan CO, Puri A, Zamani AA, Mehregan A, Chou S, Orzell S, Purkayastha S, Du R, Sorond FA (2014) Impaired cerebral autoregulation is associated with vasospasm and delayed cerebral ischemia in subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 45: 677–682.
- Parrot S, Sauvinet V, Riban V, Depaulis A, Renaud B, Denoroy L (2004) High temporal resolution for *in vivo* monitoring of neurotransmitters in awake epileptic rats using brain microdialysis and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Neurosci Methods*, 140: 29–38.
- Peeling RW, Holmes KK, Mabey D, Ronald A (2006) Rapid tests for sexually transmitted infections (STIs): The way forward. *Sex Transm Infect*, 82 Suppl 5: v1–6.

360 C. Allioux et al.

- Peeters W, van den Brande R, Polinder S, Brazinova A, Steyerberg EW, Lingsma HF, Maas AI (2015) Epidemiology of traumatic brain injury in Europe. *Acta Neurochirurgica*, 157: 1683–1696.
- Pernot P, Maucler C, Tholance Y, Vasylieva N, Debilly G, Pollegioni L, Cespuglio R, Marinesco S (2012) d-Serine diffusion through the blood-brain barrier: Effect on d-serine compartmentalization and storage. *Neurochem Int*, 60: 837–845.
- Pernot P, Mothet JP, Schuvailo O, Soldatkin A, Pollegioni L, Pilone M, Adeline MT, Cespuglio R, Marinesco S (2008) Characterization of a yeast D-amino acid oxidase microbiosensor for D-serine detection in the central nervous system. *Anal Chem*, 80: 1589–1597.
- Perumal V, Hashim U (2014) Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *J Appl Biomed*, 12: 1–15.
- Pluta RM, Hansen-Schwartz J, Dreier J, Vajkoczy P, Macdonald RL, Nishizawa S, Kasuya H, Wellman G, Keller E, Zauner A, Dorsch N, Clark J, Ono S, Kiris T, Leroux P, Zhang JH (2009) Cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: Time for a new world of thought. *Neurological Research*, 31: 151–158.
- Pochay P, Wise KD, Allard LF, Rutledge LT (1979) A multichannel depth probe fabricated using electron-beam lithography. *IEEE Trans Biomed Eng*, 26: 199–206.
- Pollegioni L, Falbo A, Pilone MS (1992) Specificity and kinetics of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase. *Biochim Biophys Acta*, 1120: 11–16.
- Proust F, Callonec F, Clavier E, Lestrat JP, Hannequin D, Thiebot J, Freger P (1999) Usefulness of transcranial color-coded sonography in the diagnosis of cerebral vasospasm. *Stroke*, 30: 1091–1098.
- Quinto M, Losito I, Palmisano F, Zambonin CG (2000) Needle-type glucose microbiosensor based on glucose oxidase immobilised in an overoxidised polypyrrole film (an in-vitro study). *Fres J Anal Chem*, 367: 692–696.
- Ragland J, Lee K (2016) Critical care management and monitoring of intracranial pressure. *J Neurocrit Care*, 9: 105–112.
- Raichle ME (1983) The pathophysiology of brain ischemia. *Ann Neurol*, 13: 2–10.
- Reinstrup P, Stahl N, Møllergaard P, Uski T, Ungerstedt U, Nordstrom CH (2000) Intracerebral microdialysis in clinical practice: Baseline values for chemical markers during wakefulness, anesthesia, and neurosurgery. *Neurosurgery*, 47: 701–709; discussion 709–710.
- Rogers ML, Boutelle MG (2013) Real-time clinical monitoring of biomolecules. *Ann Rev Anal Chem*, 6: 427–453.
- Rogers ML, Feuerstein D, Leong CL, Takagaki M, Niu X, Graf R, Boutelle MG (2013) Continuous online microdialysis using microfluidic sensors: Dynamic neurometabolic changes during spreading depolarization. *ACS Chem Neurosci*, 4: 799–807.
- Rogers ML, Leong CL, Gowers SA, Samper IC, Jewell SL, Khan A, McCarthy L, Pahl C, Tolia CM, Walsh DC, Strong AJ, Boutelle MG (2017) Simultaneous monitoring of potassium, glucose and lactate during spreading depolarization in the injured human brain — proof of principle of a novel real-time neurochemical analysis system, continuous online microdialysis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 37: 1883–1895.

- Roh D, Park S (2016) Brain multimodality monitoring: Updated perspectives. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 16: 56.
- Roos YB, de Haan RJ, Beenen LF, Groen RJ, Albrecht KW, Vermeulen M (2000) Complications and outcome in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage: A prospective hospital based cohort study in the Netherlands. *J Neurol Neurosurg Ps*, 68: 337–341.
- Rozhanchuk T, Tananaiko O, Mazurenko I, Etienne M, Walcarius A, Zaitsev V (2009) Electroanalytical properties of haemoglobin in silica-nanocomposite films electrogenerated on pyrolytic graphite electrode. *J Electroanal Chem*, 625: 33–39.
- Ryan MR, Lowry JP, O'Neill RD (1997) Biosensor for neurotransmitter l-glutamic acid designed for efficient use of l-glutamate oxidase and effective rejection of interference. *Analyst*, 122: 1419–1424.
- Sakadzic S, Roussakis E, Yaseen MA, Mandeville ET, Srinivasan VJ, Arai K, Ruvinskaya S, Devor A, Lo EH, Vinogradov SA, Boas DA (2010) Two-photon high-resolution measurement of partial pressure of oxygen in cerebral vasculature and tissue. *Nat Methods*, 7: 755–759.
- Sanford AL, Morton SW, Whitehouse KL, Oara HM, Lugo-Morales LZ, Roberts JG, Sombers LA (2010) Voltammetric detection of hydrogen peroxide at carbon fiber microelectrodes. *Anal Chem*, 82: 5205–5210.
- Sarrafzadeh AS, Smoll NR, Unterberg AW (2014) Lessons from the intracranial pressure-monitoring trial in patients with traumatic brain injury. *World Neurosurg*, 82: e393–395.
- Sato M, Ohishi N, Yagi K (1979) Identification of a covalently bound flavoprotein in rat liver mitochondria with sarcosine dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Comm*, 87: 706–711.
- Schulz MK, Wang LP, Tange M, Bjerre P (2000) Cerebral microdialysis monitoring: Determination of normal and ischemic cerebral metabolisms in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*, 93: 808–814.
- Schuvailo OM, Soldatkin OO, Lefebvre A, Cespuglio R, Soldatkin AP (2006) Highly selective microbiosensors for in vivo measurement of glucose, lactate and glutamate. *Anal Chim Acta*, 573–574: 110–116.
- Shacham R, Avnir D, Mandler D (1999) Electrodeposition of methylated sol-gel films on conducting surfaces. *Adv Mater*, 11: 384–388.
- Smith SK, Lugo-Morales LZ, Tang C, Gosrani SP, Lee CA, Roberts JG, Morton SW, McCarty GS, Khan SA, Sombers LA (2018) Quantitative comparison of enzyme immobilization strategies for glucose biosensing in real-time using fast-scan cyclic voltammetry coupled with carbon-fiber microelectrodes. *Chem Phys Chem*, 19: 1197–1204.
- Somjen GG (2001) Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev*, 81: 1065–1096.
- Sreenivas G, Ang SS, Fritsch I, Brown WD, Gerhardt GA, Woodward DJ (1996) Fabrication and characterization of sputtered-carbon microelectrode arrays. *Anal Chem*, 68: 1858–1864.
- Stahl N, Møllergaard P, Hallström A, Ungerstedt U, Nordström CH (2001) Intracerebral microdialysis and bedside biochemical analysis in patients with fatal traumatic brain lesions. *Acta Anaesthes Scand*, 45: 977–985.

- Stein SC, Levine JM, Nagpal S, LeRoux PD (2006) Vasospasm as the sole cause of cerebral ischemia: How strong is the evidence? *Neurosurg Focus*, 21: E2.
- Stiefel MF, Spiotta A, Gracias VH, Garuffe AM, Guillaumondegui O, Maloney-Wilensky E, Bloom S, Grady MS, LeRoux PD (2005) Reduced mortality rate in patients with severe traumatic brain injury treated with brain tissue oxygen monitoring. *J Neurosurg*, 103: 805–811.
- Tagliaferri F, Compagnone C, Korsic M, Servadei F, Kraus J (2006) A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochirurgica*, 148: 255–268; discussion 268.
- Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS (2001) Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron*, 16: 121–131.
- Tholance Y (2014) Suivi du métabolisme énergétique cérébral chez les patients victimes d'hémorragies sous-arachnoïdiennes graves: Intérêt pour le pronostic individuel et le diagnostic des complications ischémiques. Neurosciences [q-bio.NC]. Doctoral Thesis, Université Claude Bernard, Lyon, France.
- Tholance Y, Barcelos GK, Perret-Liaudet A, Omar E, Carrillon R, Grousseau S, Lieutaud T, Dailler F, Marinesco S (2017) Placing intracerebral probes to optimise detection of delayed cerebral ischemia and allow for the prediction of patient outcome in aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 37: 2820–2832.
- Tian F, Dale N (2013) Hexacyanoferrates as mediators for microelectrode biosensors. In: *Microelectrode Biosensors* (Marinesco S, Dale N, eds), pp. 69–93. Totowa, NJ: Humana Press.
- Tian F, Gourine AV, Huckstepp RT, Dale N (2009) A microelectrode biosensor for real time monitoring of L-glutamate release. *Anal Chim Acta*, 645: 86–91.
- Tian F, Liaudet E, Dale N (2007) Ruthenium purple-mediated microelectrode biosensors based on sol-gel film. *Anal Chem*, 79: 6760–6766.
- Trinka E, Hofler J, Zerbs A (2012) Causes of status epilepticus. *Epilepsia*, 53 Suppl 4: 127–138.
- Tyler AL, Mahoney JM, Richard GR, Holmes GL, Lenck-Santini PP, Scott RC (2012) Functional network changes in hippocampal CA1 after status epilepticus predict spatial memory deficits in rats. *J Neurosci*, 32: 11365–11376.
- Ueda Y, Tsuru N (1994) Bilateral seizure-related changes of extracellular glutamate concentration in hippocampi during development of amygdaloid kindling. *Epilepsy Research*, 18: 85–88.
- Vajkoczy P, Roth H, Horn P, Lucke T, Thome C, Hubner U, Martin GT, Zappletal C, Klar E, Schilling L, Schmiedek P (2000) Continuous monitoring of regional cerebral blood flow: Experimental and clinical validation of a novel thermal diffusion microprobe. *J Neurosurgery*, 93: 265–274.
- Van Gompel JJ, Bower MR, Worrell GA, Stead M, Chang SY, Goerss SJ, Kim I, Bennet KE, Meyer FB, Marsh WR, Blaha CD, Lee KH (2014) Increased cortical extracellular adenosine correlates with seizure termination. *Epilepsia*, 55: 233–244.
- Varner EL, Leong CL, Jaquins-Gerstl A, Nesbitt KM, Boutelle MG, Michael AC (2017) Enhancing continuous online microdialysis using dexamethasone: Measurement of dynamic neurometabolic changes during spreading depolarization. *ACS Chem Neurosci*, 8: 1779–1788.

- Vasylieva N, Marinesco S (2013) Enzyme immobilization on microelectrode biosensors. In: *Microelectrode Biosensors* (Marinesco S, Dale N, eds), pp. 95–114. Totowa, NJ: Humana Press.
- Vasylieva N, Marinesco S, Barbier D, Sabac A (2015) Silicon/SU8 multi-electrode micro-needle for *in vivo* neurochemical monitoring. *Biosens Bioelectron*, 72: 148–155.
- Vasylieva N, Maucler C, Meiller A, Viscogliosi H, Lieutaud T, Barbier D, Marinesco S (2013) Immobilization method to preserve enzyme specificity in biosensors: Consequences for brain glutamate detection. *Anal Chem*, 85: 2507–2515.
- Vasylieva N, Barnych B, Meiller A, Maucler C, Pollegioni L, Lin JS, Barbier D, Marinesco S (2011) Covalent enzyme immobilization by poly(ethylene glycol) diglycidyl ether (PEGDE) for microelectrode biosensor preparation. *Biosens Bioelectron*, 26: 3993–4000.
- Venton BJ, Robinson TE, Kennedy RT, Maren S (2006) Dynamic amino acid increases in the basolateral amygdala during acquisition and expression of conditioned fear. *Eur J Neurosci*, 23: 3391–3398.
- Vergouwen MD, Vermeulen M, Coert BA, Stroes ES, Roos YB (2008) Microthrombosis after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: An additional explanation for delayed cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28: 1761–1770.
- Vergouwen MD, Vermeulen M, van Gijn J, Rinkel GJ, Wijdicks EF, Muizelaar JP, Mendelow AD, Juvela S, Yonas H, Terbrugge KG, Macdonald RL, Diringner MN, Broderick JP, Dreier JP, Roos YB (2010) Definition of delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage as an outcome event in clinical trials and observational studies: Proposal of a multidisciplinary research group. *Stroke*, 41: 2391–2395.
- Vespa P, Bergsneider M, Hattori N, Wu HM, Huang SC, Martin NA, Glenn TC, McArthur DL, Hovda DA (2005) Metabolic crisis without brain ischemia is common after traumatic brain injury: A combined microdialysis and positron emission tomography study. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25: 763–774.
- von Bornstadt D, Houben T, Seidel JL, Zheng Y, Dilekoz E, Qin T, Sandow N, Kura S, Eikermann-Haerter K, Endres M, Boas DA, Moskowitz MA, Lo EH, Dreier JP, Woitzik J, Sakadzic S, Ayata C (2015) Supply-demand mismatch transients in susceptible peri-infarct hot zones explain the origins of spreading injury depolarizations. *Neuron*, 85: 1117–1131.
- von Oettingen G, Bergholt B, Gyldensted C, Astrup J (2002) Blood flow and ischemia within traumatic cerebral contusions. *Neurosurgery*, 50: 781–788; discussion 788–790.
- Wang J (2008) Electrochemical glucose biosensors. *Chem Rev*, 108: 814–825.
- Wassum KM, Tolosa VM, Wang J, Walker E, Monbouquette HG, Maidment NT (2008) Silicon wafer-based platinum microelectrode array biosensor for near real-time measurement of glutamate *in vivo*. *Sensors*, 8: 5023–5036.
- Welch ME, Doublet T, Bernard C, Malliaras GG, Ober CK (2015) A glucose sensor via stable immobilization of the GOx enzyme on an organic transistor using a polymer brush. *J Polym Sci Pol Chem*, 53: 372–377.
- Weltin A, Kieninger J, Enderle B, Gellner AK, Fritsch B, Urban GA (2014) Polymer-based, flexible glutamate and lactate microsensors for *in vivo* applications. *Biosens Bioelectron*, 61: 192–199.

- Weltin A, Kieninger J, Urban GA (2016) Microfabricated, amperometric, enzyme-based biosensors for in vivo applications. *Anal Bioanal Chem*, 408: 4503–4521.
- Willner I, Heleg-Shabtai V, Blonder R, Katz E, Tao GL, Buckmann AF, Heller A (1996) Electrical wiring of glucose oxidase by reconstitution of FAD-modified monolayers assembled onto Au-electrodes. *J Am Chem Soc*, 118: 10321–10322.
- Wilson GS, Zhang Y (2009) Introduction to the Glucose Sensing Problem, in *In Vivo Glucose Sensing* (Cunningham DD, Stenken JA, eds). Vol. 174, pp. 1–27: Wiley, Hoboken, NJ.
- Wintermark M, Sesay M, Barbier E, Borbely K, Dillon WP, Eastwood JD, Glenn TC, Grandin CB, Pedraza S, Soustiel JF, Nariai T, Zaharchuk G, Caille JM, Dousset V, Yonas H (2005) Comparative overview of brain perfusion imaging techniques. *Stroke*, 36: e83–99.
- Wise KD, Angell JB, Starr A (1970) An integrated-circuit approach to extracellular micro-electrodes. *IEEE Trans Biomed Eng*, 17: 238–247.
- Woeffler-Maucler C, Beghin A, Ressenkoff D, Bezin L, Marinesco S (2014) Automated immunohistochemical method to quantify neuronal density in brain sections: Application to neuronal loss after status epilepticus. *J Neurosci Methods*, 225: 32–41.
- Woitzik J, Hecht N, Pinczolits A, Sandow N, Major S, Winkler MK, Weber-Carstens S, Dohmen C, Graf R, Strong AJ, Dreier JP, Vajkoczy P, group Cs (2013) Propagation of cortical spreading depolarization in the human cortex after malignant stroke. *Neurology*, 80: 1095–1102.
- Woodroffe MN, Sarna GS, Wadhwa M, Hayes GM, Loughlin AJ, Tinker A, Cuzner ML (1991) Detection of interleukin-1 and interleukin-6 in adult rat brain, following mechanical injury, by in vivo microdialysis: Evidence of a role for microglia in cytokine production. *J Neuroimmunol*, 33: 227–236.
- Yorita K, Janko K, Aki K, Ghisla S, Palfey BA, Massey V (1997) On the reaction mechanism of L-lactate oxidase: Quantitative structure-activity analysis of the reaction with para-substituted L-mandelates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 9590–9595.
- Yu B, Long N, Moussy Y, Moussy F (2006) A long-term flexible minimally-invasive implantable glucose biosensor based on an epoxy-enhanced polyurethane membrane. *Biosens Bioelectron*, 21: 2275–2282.
- Zain ZM, O'Neill RD, Lowry JP, Pierce KW, Tricklebank M, Dewa A, Ab Ghani S (2010) Development of an implantable D-serine biosensor for in vivo monitoring using mammalian D-amino acid oxidase on a poly (o-phenylenediamine) and Nafion-modified platinum-iridium disk electrode. *Biosens Bioelectron*, 25: 1454–1459.
- Zhu L, Yang R, Zhai J, Tian C (2007) Bionzymatic glucose biosensor based on co-immobilization of peroxidase and glucose oxidase on a carbon nanotubes electrode. *Biosens Bioelectron*, 23: 528–535.
- Zoerle T, Carbonara M, Zanier ER, Ortolano F, Bertani G, Magnoni S, Stocchetti N (2017) Rethinking neuroprotection in severe traumatic brain injury: Toward bedside neuroprotection. *Front Neurol*, 8: 354.

Annexe 2 – Curriculum Vitæ

Clélia ALLIOUX

E-mail : clelia.allieux@wanadoo.fr

DIPLÔMES

- 2017 – 2021 **Doctorat en Neurosciences et Cognition**, ED NSCo 476 – Université Claude Bernard Lyon 1
Dr Stéphane MARINESCO - Equipe TIGER, Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, France
Financement : Bourse de la Région Auvergnnes-Rhône-Alpes
Modélisation du traumatisme crânien sévère chez le rat par la technique de percussion latérale de fluide : effet sur le bien-être animal et évolution temporelle des séquelles
- 2013 – 2015 **Master Sciences Biomédicales, Neurosciences** – Université de Rouen
- 2010 – 2013 **Licence Biochimie, Biologie cellulaire et moléculaire, et Physiologie** - Université de Rouen

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

- 2019 - 2021 **Membre de la Structure chargée du Bien-être des animaux**
Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, site du Neurocampus M. Jouvét, France
- 2015 - 2016 **Ingénieure d'étude en expérimentation animale**
UMR6301 ISTCT, équipe CERVOxy, Centre Cyceron, Caen
Etude des zéolithes-FAUJASITE injectés chez des rats et des souris qui ont ou non une tumeur striatale.
- 2015 **Technicienne en expérimentation animale**
INSERM U1028 – CNRS UMR5292, CRNL, équipe WAKING, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon
- 2015 **INSERM U1028 – CNRS UMR5292, CRNL, équipe WAKING**
(6 mois) Dr. Stéphane Marinesco – Université Claude Bernard de Lyon 1, Lyon
Suivi de la concentration extracellulaire de D-sérine au cours d'un status epilepticus chez le rat vigile en utilisant des microbiocapteurs électrochimiques enzymatiques.
- 2014 **Service de Neuropsychiatrie**
(4 mois) Dr. Armand Savioz - Hôpitaux Universitaires de Genève, Chêne-Bourg – Suisse
Démonstration de l'effet neuroprotecteur de l'acide all-trans rétinolique sur la formation de cassures double-brin d'ADN causées par le β -amyloïde 1-42 sur des cellules SH-SY5Y et des coupes de cerveaux de souris
- 2013 - 2014 **Technicienne de laboratoire**
FRESENIUS KABI France, Louviers
- 2013 **Service de Neuropsychiatrie**
(2 mois) Dr. Armand Savioz - Hôpitaux Universitaires de Genève, Chêne-Bourg – Suisse

FORMATIONS

- 2020 Formation continue « Anesthésie et analgésie chez les rongeurs » – Animaform
- 2019 Formation continue « Le sexe, une variable à ne pas négliger » – Celphedia, Lyon
- 2019 Formation continue « Les points limites » – CRNS, Villeurbanne
- 2018 Formation continue « Les grands points de la réglementation française » – SAFE, Bron
- 2017 Formation « Initiation à la chirurgie expérimentale » – VetAgro, Marcy l’Etoile
- 2016 Formation « IMR petit animal, Bruker 7T » – Plateforme d’imagerie CYCERON, Caen
- 2016 Diplôme Universitaire « Expérimentation animale appliquée à la recherche biomédicale » – Université de Lyon

COMPETENCES TECHNIQUES

Expérimentations animale

- Contention, manipulation, *nursing*, soin (rat, souris, OGM dont *nude*)
- Chirurgie : cathétérisations fémorale/caudale, modèle de traumatisme crânien, modèle tumorale striatale, craniotomie, stéréotaxie
- Electrophysiologie : Fabrication et utilisation de biocapteurs enzymatiques et enregistrements électrochimiques, EcoG
- Tests comportementaux : GaitLab, Rotarod, Piscine de Morris, exploration aquatique, zero-maze, Open Field, reconnaissance d’objet
- Mise à mort des animaux
- Prélèvements d’organes et de sang

Electrophysiologie

- Electrocorticographie
- Fabrication et utilisation de biocapteurs enzymatiques et enregistrements électrochimiques

Biologie Cellulaire

- Cultures de lignées cellulaires et cultures primaires
- Culture cellulaire en condition hypoxique (chambre à hypoxie)
- *Single cell gel electrophoresis assay*

Imagerie

- IRM petit animal (7T)
- Méthode de coupe tissulaire au freezing microtome et au cryostat
- Immunohistochimie

Informatique

- ImageJ, FIJI (traitement et analyse d’images)
- Igor Pro (programme de traitement de données scientifique)
- LabChart (programme d’acquisition et d’analyse de données scientifiques)
- GraphPad
- EthoVision XT
- Microsoft Office

ENSEIGNEMENTS ET ENCADREMENTS

- 2017-2019 Activité d'enseignement à l'Université Claude Bernard Lyon 1
DUT Génie Biologie, 1^{ère} année pour des TP Physiologie animale (~100 h)
- 2021 Etudiant en Master 1 Neurosciences - Université de Lyon 1 Claude Bernard
- 2020 Etudiante en Master 2 Biotechnologie : neuro- et physiologie appliquée - Université de Lorraine
- 2019 Etudiante en Licence Biologie Moléculaire et génétique - Université de Demiroglu Bilim, Turquie
- 2019 Etudiante en médecine 2^{ème} année -Université de Lyon
- 2018 Etudiante en 1^{ère} année DUT Génie biologie - Université de Lyon
- 2018 Etudiante en Master 1 Biologie intégrative et physiologie - Université de Lyon

VULGARISATIONS SCIENTIFIQUES

- 2017 Journée scientifique de la SFR Santé Lyon Est – Lyon (organisation)
- 2016 Fête de la science – Caen (animation)

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications

Allioux C, Meiller A, Balanca B, Marinesco S (2019) **MONITORING BRAIN INJURY WITH MICROELECTRODE BIOSENSORS**. In: Compendium of In Vivo Monitoring in Real-Time Molecular Neuroscience, pp 325-364: WORLD SCIENTIFIC.

Anfray C, Komaty S, Corroyer-Dulmont A, Zaarour M, Helaine C, Ozcelik H, Allioux C, Toutain J, Goldyn K, Petit E, Bordji K, Bernaudin M, Valtchev V, Touzani O, Mintova S, Valable S (2020) **Nanosized zeolites as a gas delivery platform in a glioblastoma model**. Biomaterials 257:120249.

Gruz-Gibelli E, Chessel N, Allioux C, Marin P, Piotton F, Leuba G, Herrmann FR, Savioz A (2016) **The Vitamin A Derivative All-Trans Retinoic Acid Repairs Amyloid- β -Induced Double-Strand Breaks in Neural Cells and in the Murine Neocortex**. Neural Plast 2016:3707406.

Communications orales

Allioux C. **Dysfunctions in brain metabolism after traumatic brain injury evidenced by microelectrode biosensors**. Symposium BRAIN & BRAIN PET, 2019, Yokohama, Japon

Allioux C. **Evidence for a traumatic penumbra induced by severe traumatic brain injury in rats**. Journée scientifique de la SFR Santé Lyon Est, 2108, Lyon

Allioux C. **Monitoring des dépolarisations corticales envahissantes dans un modèle de traumatisme crânien sévère chez le rat**. Journée scientifique annuelle de l'Ecole Doctorale, 2017, Lyon

Communication affichée

Allioux C, Pivotto S, Marinesco S. **Blood-brain barrier permeability after severe traumatic brain injury in the rat model**. Journée scientifique annuelle de l'Ecole Doctorale, 2018, Lyon

