Métabolisme cérébral au décours d'un traumatisme crânien diffus ; impact de trois thérapeutiques : érythropoïétine, mannitol, lactate de sodium

Anne Millet

▶ **To cite this version:**

Anne Millet. Métabolisme cérébral au décours d'un traumatisme crânien diffus ; impact de trois thérapeutiques : érythropoïétine, mannitol, lactate de sodium. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAS021 . tel-01693068

HAL Id: tel-01693068
https://theses.hal.science/tel-01693068

Submitted on 25 Jan 2018

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.

Communauté
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Modèles, méthodes et algorithmes en biologie**
Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Anne Millet
Née le 16/11/1983 à Chatenay Malabry (92)

Dirigée par le Pr **Jean-François PAYEN**
Préparée au sein du **Grenoble Institut des Neurosciences**
Dans **l'Ecole Doctorale Ingénierie de la Santé, la Cognition et l'Environnement**

Métabolisme cérébral au décours d'un traumatisme crânien diffus. Impact de trois thérapeutiques : érythropoïétine, mannitol, lactate de sodium.

Thèse soutenue publiquement le **26 Juin 2017**,
devant le jury composé de :
Monsieur le Docteur Emmanuel L. BARBIER,
Directeur de recherche, INSERM, Grenoble
Madame le Dr Myriam BERNAUDIN, Rapporteur
Directrice de recherche, CNRS, Caen
Monsieur le Professeur Thierry DEBILLON,
PU-PH CHU Grenoble
Monsieur le Professeur Etienne JAVOUHEY, Rapporteur
PU-PH CHU Lyon
Monsieur le Professeur Mauro ODDO, président du jury
Maître d'enseignement et de recherche, Lausanne
Monsieur le Professeur Jean François PAYEN, Directeur de thèse
PU-PH CHU Grenoble

SOMMAIRE

I. Introduction 14

A. Physiopathologie des lésions cérébrales au décours d'un traumatisme crânien : œdème cérébral post traumatique. 14

1. Introduction 14

2. Physiopathologie 15

a. Œdème cérébral vasogénique 17

b. Œdème cérébral cytotoxique 19

c. Aquaporines (AQP) 20

d. Méthodes d'évaluation de l'œdème cérébral 21

3. Conclusion 23

B. Hypoxie cérébrale post traumatique 24

1. Généralités 24

2. Paramètres de l'oxygénation 25

3. Méthodes d'évaluation de l'oxygénation 28

4. Conclusion 32

C. Dysfonction mitochondriale post traumatique 33

1. Introduction 33

2. Fonctions mitochondriales 34

3. Structure moléculaire et régulation du mPTP 36

4. Rôle du Calcium 39

5. Nécrose et apoptose cellulaire 41

6. Dysfonction mitochondriale post traumatique 44

7. Méthodes d'évaluation de la fonction mitochondriale 48

8. Conclusion 51

D. Métabolisme cérébral du glucose et du lactate : conditions normales et pathologiques post traumatiques 52

1. Glycolyse : généralités 52

2. Glycolyse post traumatique : origine du lactate endogène 54

3. Méthodes d'évaluation du métabolisme cérébral 58

4. Conclusion 61

II. Thérapeutiques étudiées 62
A. Introduction 62

B. Erythropoïétine 63
1. Généralités 63
2. Effets au cours du traumatisme crânien 64

C. Mannitol 66
1. Généralités 66
2. Effets au cours du TC 66

D. Lactate de sodium 68
1. Généralités 68
2. Apport de lactate exogène 68

E. Conclusion 70

III. Etudes réalisées 71
A. Méthodes communes 71
1. Modèle animal 71
2. Modèle de traumatisme crânien 71
3. Préparation des animaux 72

B. Méthodes spécifiques 73
1. Etude 1 : Effet de la rhEpo dans un modèle de TC diffus sur l'œdème cérébral et l'hypoxie tissulaire. 73
a. Justification 73
b. Hypothèses 73
c. Aspects spécifiques méthodologiques 74
d. Résultats 86
e. Conclusion 87
2. Etude 2 : Etude de l'administration de mannitol post traumatique sur l'œdème cérébral et l'hypoxie tissulaire post traumatique dans un modèle de TC diffus chez le rat. 88
a. Justification 88
b. Hypothèses 88
c. Aspects méthodologiques spécifiques 89
d. Résultats 97
e. Conclusion 98
3. Etude 3 : Effet de la rhEpo et de la CEpo sur la dysfonction mitochondriale post traumatique dans un modèle de TC diffus. 99
a. Justification 99
b. Hypothèses 100
c. Aspects méthodologiques spécifiques 100
d. Résultats 113
e. Conclusion 114
4. Etude 4 : Effet d'une solution hypertonique de lactate de sodium sur le métabolisme cérébral post traumatique. 115
a. Justification 115
b. Hypothèses 115
c. Méthodes spécifiques 116
d. Résultats 152
e. Conclusion 153

IV. Perspectives 154

Curriculum Vitae

Anne MILLET
Né le 16 Novembre 1983 à Châtenay Malabry (92)
N° Ordre des médecins :
N° ADELI :, N° RPPS : 10100400778

TITRES :

- Praticien Hospitalier Universitaire depuis Mai 2016 (Hôpital Couple Enfant CHU Grenoble – Pr Debillon)
- Assistante Chef de Clinique en Réanimation Pédiatrique Novembre 2012-Mai 2016 (Hôpital Couple Enfant CHU Grenoble – Pr Debillon)
- Thèse de sciences « Métabolisme cérébral au décours d'un traumatisme crânien diffus. Effets de trois thérapeutiques : Erythropoïétine, mannitol et lactate de sodium » - Directeur de thèse : Pr Payen. Début en Janvier 2013 (Equipe 5, INSERM U836 - Institut des Neurosciences Grenoble ; Ecole doctorale EDISCE - UJF Grenoble).
- DES pédiatrie (Avril 2012) : « Etude du dysfonctionnement mitochondrial dans un modèle de traumatisme crânien chez le rat »
- Thèse de médecine (Octobre 2012) : « DOLOREA PEDIA : Sufentanil versus Alfentanil en bolus avant les aspirations trachéales chez l'enfant intubé ventilé »
- Master 2 de recherche 2010-2011 (Equipe 5, INSERM U836 - Institut des Neurosciences Grenoble ; UCBL 1)
- Interne 3ème Cycle des Etudes Médicales en DES de Pédiatrie 2007-2012 (UJF Grenoble)
- ECN 2007, reçue 512ème
- 1er et 2ème Cycles des Etudes Médicales 2001-2007 (Faculté de médecine Paris XI)

FORMATIONS :

- DIU Pédagogie Médicale 2014-2015 (UJF Grenoble)
- DIU Neuroréanimation 2013-2014 (UJF Grenoble)
- DIU Réanimation et d'Urgences Pédiatriques 2011-2013 (UCBL Lyon 1)
- DES pédiatrie 2007-2012 : « Etude du dysfonctionnement mitochondrial dans un modèle de traumatisme crânien chez le rat »
- Master 2 Physiologie Intégrée en Conditions Extrêmes 2010-2011 - Bourse d'année recherche et Abbott JFRN 2010: « Etude du dysfonctionnement mitochondrial dans un modèle de traumatisme crânien chez le rat – Effet de l'Erythropoïétine » - Pr Payen (Equipe 5, INSERM U836, Institut des Neurosciences Grenoble - UCBL 1)
- DESC Réanimation Médicale 2009-2011 (UJF Grenoble)
- Maîtrise des Sciences Biologiques et Médicales d'Anatomie et morphogénèse 2004 et Maîtrise des Sciences Biologiques et Médicales de Physiologie et biologie intégrées du système cardiovasculaire 2004 (Faculté de médecine Paris XI)

TRAVAUX ET PUBLICATIONS:

Recherche clinique :

1. Thèse de médecine : **A. Millet**, I. Wroblewski, S. David Tchouda, C. Tournaire, A. Desrumaux, V. Payen, A. Gayot, M. Cartal, JF. Payen, T. Debillon. DOLOREA PEDIA: Essai clinique monocentrique randomisé contrôlé en double aveugle

Alfentanil versus Sufentanil à but analgésique chez les enfants intubés ventilés en réanimation infantile avant une aspiration trachéale.
Avis du C.P.P favorable : 03/02/2010. Autorisation Afssaps : 08/04/2010. Etude en cours de Juin 2010 à Avril 2012.
Soumis et revise en janvier 2017 pour Anaesthesia Critical Care & Pain Medicine

2. ***A. Millet,*** *E. Delacroix, I. Wroblewski, A. Ego, I. Pin, T. Debillon*. Factors associated with severe bronchiolitis: a monocentric retrospective study. En cours de soumission.

Recherche expérimentale :

1. *P. Bouzat,* ***A. Millet****, C. Batandier, T. Debillon, E. Fontaine, E. Barbier, J.-F. Payen.* Changes in brain tissue oxygenation after treatment of diffuse traumatic brain injury by erythropoietin. Crit Care Med. 2013 May;41(5):1316-24.
2. ***A. Millet****, P. Bouzat, T. Trouve-Buisson, C. Batandier, K. Pernet-Gallay, A. Daoust, L. Gaide Chevronnay, R. Farion, E. Barbier, T. Debillon, E. Fontaine, J. F. Payen.*M. Erythropoietin and its derivates modulate mitochondrial dysfunction after diffuse traumatic brain injury. J Neurotrauma. 2016 Mar 15.
3. *C. Schilte, P. Bouzat,* ***A. Millet****, P. Boucheix, K. Pernet-Gallay , B. Lemasson, E.L. Barbier, J.F. Payen.*Mannitol improves brain tissue oxygenation in a model of diffuse traumatic brain injury. Crit Care Med. 2015 Oct;43(10):2212-8.

Recherche clinique:

1. ***A. Millet****, G.S. Salomons, F. Cneude, C. Corne, C. Jakobs, E. Struys, S. Hamelin.*Novel mutations in Pyridoxine-Dependent Epilepsy. European Journal of Pediatric Neurology. 2011 Jan;15(1):74-7.
2. ***A. Millet****, E. Hullo, C. Armari Alla, C. Bost-Bru, C. Durand, F. Nugues, A. Eid, D. Plantaz.*Sickle cell disease and invasive osteoarticular Salmonella infections. Arch Pediatr. 2012 Mar;19(3):267-70.
3. ***A. Millet****, A. Desrumaux, A. Gayot, A. Tristan, G. Emeriaud, T. Debillon, I. Wroblewski.* Community acquired Staphylococcus Aureus necrotizing pneumoniae secreting Panton Valentine Leucocidin in an infant. Arch Pediatr. 2012 Jul;19(7):718-21.
4. *E. Lametery, F. Dubois-Teklali,* ***A. Millet*** *, V. Manel.* Le syndrome pharyngo-cervico-brachial: atteinte bulbaire sévère dans le cadre d'un syndrome de Guillain Barré atypique. Arch Pediatr. 2016 Feb;23(2):176-9.
5. *C. Tanné, E. Javouhey,* ***A. Millet,*** *F. Bordet.* Severe Tramadol Overdoses in Children: A Case Series Admitted to Paediatric Intensive Care Unit. *J Clin Toxicology 2016, 6:5*

SOCIETE SAVANTE:

Membre du Groupe Francophone de Réanimation et d'Urgences Pédiatriques.

Résumé : Un dysfonctionnement du métabolisme cérébral est observé au décours d'un traumatisme crânien (TC). L'œdème cérébral et l'hypoxie cérébrale post-traumatiques sont des acteurs principaux de l'apparition des lésions ischémiques secondaires responsables en partie de la défaillance énergétique. Cette hypoxie tissulaire résulte de troubles macrocirculatoires, de troubles de la microcirculation et/ou de troubles de la diffusion de l'oxygène des capillaires sanguins aux tissus. La baisse de la consommation en oxygène est également liée à une dysfonction mitochondriale post traumatique de la chaine respiratoire. Ces phénomènes ischémiques ou hypoxiques aboutissent ainsi à une élévation de lactate endogène en condition anaérobie. Cependant, l'élévation de lactate endogène post traumatique est liée majoritairement à une crise métabolique conduisant à une hyperglycolyse en dehors de tout phénomène hypoxique ou ischémique. L'objectif de notre étude était donc d'étudier l'œdème cérébral, l'oxygénation cérébrale, la défaillance mitochondriale post traumatique et le métabolisme cérébral dans un modèle expérimental de traumatisme crânien diffus par impact accélération chez l'animal. Nous avons étudié les effets de différentes thérapeutiques sur le métabolisme cérébral à l'aide d'un monitorage multimodal. Les effets de la rhEpo (5000UI/Kg), de la CEpo (50µg/Kg), du mannitol (1g/kg) et du lactate de sodium molaire (1.5 ml/Kg soit 3mOsm/kg) ont été étudiés sur l'œdème cérébral (IRM, microscopie électronique), sur l'hypoxie cérébrale tissulaire (IRM BOLD, mesure de la pression tissulaire en O2, saturation veineuse en O2 du sinus longitudinal supérieur), sur le métabolisme cérébral (spectroRMN) et sur la mitochondrie (analyse de la capacité de rétention calcique, de la chaine respiratoire, microscopie électronique et mesure du calcium intramitochondrial) chez des rats wistar mâles. Notre hypothèse était que l'injection de ces différentes thérapeutiques permettait d'améliorer le métabolisme cérébral post traumatique par des effets bénéfiques sur l'œdème cérébral, sur l'hypoxie tissulaire ou sur la dysfonction mitochondriale post TC. Nos résultats ont démontré que la rhEpo avait un effet bénéfique sur l'hypoxie cérébrale post traumatique par le biais d'une diminution de l'œdème cérébral péri capillaire en phase aigue associée à une diminution de la dysfonction mitochondriale proapoptotique tout comme la CEpo. Le mannitol améliore également l'hypoxie cérébrale post traumatique en jouant sur la microvascularisation cérébrale perturbée par l'œdème astrocytaire péri capillaire. Enfin, le lactate de sodium molaire avait des effets bénéfiques anti œdémateux et vasodilatateurs diminuant ainsi l'hypoxie cérébrale permettant d'améliorer le fonctionnement de la chaine respiratoire mitochondriale et ainsi la crise métabolique post traumatique. Ces résultats permettent d'améliorer la compréhension de la physiopathologie des lésions survenant au décours du traumatisme crânien ainsi que les mécanismes d'action de différentes thérapeutiques.

Mots clés : Traumatisme crânien, œdème cérébral, hypoxie cérébrale, érythropoïétine recombinante humaine, lactate de sodium molaire, mannitol, métabolisme cérébral, dysfonction mitochondriale.

Abstract: Cerebral metabolism is impaired after a Traumatic Brain Injury (TBI). Post traumatic cerebral edema and hypoxia are mainly responsible for the development of secondary ischemic lesions after TBI leading to metabolic impairment. Tissular hypoxia can result from disorders in macro and microcirculation and/or disturbance in the diffusion of oxygen from the blood capillaries to tissue. The decrease in oxygen consumption observed after brain injury is also related to a post traumatic dysfunction of the mitochondrial respiratory chain. These ischemic or hypoxic phenomena may be responsible for metabolic disorders leading to elevated level of endogenous lactate under anaerobic conditions. However, the elevation of endogenous lactate is mainly the consequence of a metabolic crisis that led to a state of hyperglycolysis without cerebral hypoxia or ischemia after TBI. The aim of our study was to investigate cerebral edema, cerebral oxygenation, mitochondrial and metabolic impairment post TBI in an experimental model of impact acceleration diffuse brain injury in rats. We also analyzed the effects of various agents on cerebral metabolism using a multimodal monitoring. The effects of rhEpo (5000UI/Kg), CEpo (50µg/Kg), mannitol (1g/Kg) and of molar sodium lactate (1.5 ml/Kg or 3mOsm/kg) were investigated on brain edema (MRI, electronic microscopy), on brain tissue hypoxia (BOLD MRI, measurement of the tissular pressure of O2, venous O2 saturation of the upper longitudinal sinus), on brain metabolism (Magnetic Resonance Spectroscopy) and on mitochondria (study of the calcium retention capacity, of the respiratory chain, morphological analysis with electronic microscopy and measurement of intramitochondrial calcium) in male wistar rats. We hypothesized that the injection of various agents would improve posttraumatic cerebral metabolism by improving cerebral edema, tissular oxygenation and as a consequence mitochondrial function. On the early phase of TBI, we demonstrated that rhEpo had a beneficial effect on post traumatic cerebral hypoxia by decreasing post-traumatic cerebral capillaries collapse due to astrocytic end-foot swelling. This effect was associated with an improvement in cellular apoptosis induced by mitochondrial pathways as CEpo. Mannitol improved brain hypoxia by decreasing peri vascular astrocytic edema. Sodium lactate had benefic effects on cerebral hypoxia by decreasing cerebral edema and on cerebral hemodynamic status with vasodilatation allowing the improvement of respiratory chain and metabolic impairments after TBI. These results help understanding physiopathological events after TBI and the various effects of different agents that can be used in future clinical research.

Key words: Traumatic brain injury, cerebral edema, brain hypoxia, recombinant human erythropoietin, molar sodium lactate, cerebral metabolism, mannitol, mitochondrial dysfunction.

Abréviations

2D 2 dimensions
3D 3 dimensions

AAT Aspartate AminoTransferase
ACM Artère cérébrale moyenne
ACSOS Agressions Cérébrales Systémiques origine Secondaires
ADC Apparent diffusion coefficient
ADN Acide désoxyribonucléique
ADP Adenosine Diphosphate
AIF Apoptosis inducing factor
AMPA Acide a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionique
ANT Transporteur des nucleotides adényliques
ANLS Astrocyte Neuronal Lactate Shuttle
APAF Apoptosis Protease Activating Factor
AQP Aquaporine
ARNm Acide ribonucléique messager
ARNt Acide ribonucléique de transfert
ADP Adénosine diphosphate
ATP Adenosine triphosphate
AVC Accident vasculaire cérébral

B_0 Champ statique
βcR Récepteur commun Beta
BHE Barrière hémato-encéphalique
BOLD Blood oxygen level dependant
BSA Bovine serum albumine
BVf Blood volume fraction

Caspase Cysteinyl aspartate-specific proteinase
CBF Cerebral blood flow
CBV Cerebral blood volume
CEI Contenu en eau intra-cérébral
CEpo Erythropoïétine carbamylée
GCS Glasgow Coma Scale
CoCK Creatine kinase
$CMRO_2$ Cerebral metabolic rate of oxygen
COX Cyclo-oxygénase
CRC Capacité de rétention calcique
Cr Creatine
CsA Ciclosporine A
Cte Constante
CycID Cyclophiline D
Cyt c Cytochrome c

DAI Diffuse Axonale Injury

DAVO2: Différence artério veineuse en O2
DMSO Diméthylsulfoxide
DSC Débit sanguin cérébral
DTC Doppler trans-crânien
Δ χ_0 Différence de susceptibilité magnétique

EEG Electroencéphalographie
EGTA Ethylene glycol tetraacetic acid
EPI Echo-planar-imaging
Epo Erythropoïétine
Erk Extracellular-signal- regulated kinase
$EtCO_2$ End-tidal CO_2

FADH2 flavine adenine dinucleotide
FIO_2 Fraction inspirée d'oxygène
FOV Field of view
F(t) inhomogénéités macroscopiques de champ

G Gauge
GCS Glasgow Coma Scale
GLUT1/3 Transporteur de glucose 1/3
G/M Glutamate/malate
GOSE Glasgow Outcome Score Extended

HbO_2 Hémoglobine oxygénée
Hb Hémoglobine
HCA Hydroxycarboxylic Acid Receptor
HEPES Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HIF Hypoxia inductible factor
Hct Hématocrite
HK hexokinase
HSA Hémorragie sous-arachnoïdienne
HTIC Hypertension intra-crânienne

IAP Inhibitor of Apoptosis Protein
IGF Insulin growth factor
IL-1β Interleukine-1β
IPC Ischemic PreConditionning
IRM Imagerie par résonance magnétique
IRMf Imagerie fonctionnelle par résonance magnétique

JAK Janus Tyrosine kinase

kDa KiloDalton
KG KetoGlutarate
KO Knock-out

LAD Lésion axonale diffuse
LCR Liquide céphalo-rachidien
LDH Lactate DesHydrogenase

ISO_2 Saturation locale en oxygène

MAO Monoamine oxydase
MAPK ras-Mitogen-Activated Protein Kinase
MAS Malate Aspartate Shuttle
MCT Monocarboxylate Transporteur
MDH Malate DesHydrogenase
MGE Séquence d'écho de gradient multiple
MKGDH Malate KetoGlutarate Deshydrogenase
mmHg Millimètre de mercure
MMP Métalloprotéase de la matrice
MOPS 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid
mPTP Pore mitochondrial de transition de perméabilité
MTT Mild transit time

NADH Nicotinamide adenine dinucleotide
NCE Na+ dependent Calcium Entry
NICE Na+ Independent Calcium Entry
NF- κB Nuclear factor kappa B
NIRS Near infrared spectroscopy
NMDA N-méthyl-D-aspartate
NO Monoxyde d'azote
NOS NO synthase

OC OEdème cérébral
OEF Oxygen extraction fraction

PAM Pression artérielle moyenne
PaO_2 Pression partielle artérielle en oxygène
$PaCO_2$ Pression partielle artérielle en dioxyde de carbone
PBR Récepteur des benzodiazépines
PBS Tampon phosphate salin
PCr Phosphocreatine
PDGF Platelet derived growth factor
PET Positon emission tomography
Pi Phosphate inorganique
PIC Pression intra-crânienne
PI3K Phophatidylinositol 3-Kinase
PLA2 Phospholipase A2
PLC Proteine lipase C
PO_2 Pression partielle en oxygène
PPC Pression de perfusion cérébrale
ppm Partie par million
$PtiO_2$ Pression tissulaire en oxygène

R_1 Constante de relaxation longitudinale
R_2 Constante de relaxation transversale
R-Epo Récepteur à l'érythropoïétine
Rh-Epo Erythropoïétine recombinante humaine
RISK Reperfusion Injury Salvage Kinase

RLs Radicaux libres
RMN Résonnance magnétique nucléaire
ROI Region of interest
ROS Reactive Oxygen Species

SaO_2 Saturation artérielle en oxygène
SB Substance Blanche
SIMP Soluble Inter Membrane mitochondrial Proteins
SNC Système nerveux central
SO Stress Oxydant
SO_2 Saturation en oxygène
SRM Spectroscopie par résonance magnétique
SSH Sérum Salé Hypertonique
SsO_2 Saturation veineuse du sinus longitudinal supérieur
STAT Signal Transducer and Activator of Transcription
SvO_2 Saturation veineuse en oxygène
$SvjO_2$ Saturation veineuse jugulaire en oxygène

T Tesla
T_1 Temps de relaxation longitudinal
T_2 Temps de relaxation transversal
TC Traumatisme crânien
TCr Creatine totale
TE temps d'écho
TEP Tomographie par émission de positons
TJ Tight Junction
TTM Temps de transit moyen
TNFα Facteur nécrosant des tumeurs α
TR Temps de répétition
TRIS Tris(hydroxymethyl)aminomethane

UQ Ubiquinone

VDAC Porine ou voltage-dependant anion channel
VDCC: Voltage dependant Calcium Chanel
VEGF Vascular Endothélial Growth Factor
VSC Volume sanguin cérébral

Préambule

Actuellement après la survenue d'un traumatisme crânien, seuls des traitements symptomatiques permettent de limiter l'extension des lésions secondaires responsables de la morbimortalité importante de cette pathologie. Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche menée depuis plus d'une dizaine d'années sur l'effet de différentes thérapeutiques au décours d'un traumatisme crânien au sein de l'équipe 5 dirigée par Emmanuel Barbier « Neuroimagerie fonctionnelle et perfusion cérébrale » de l'Institut des Neurosciences de Grenoble (GIN) sous la direction du Pr Jean-François Payen. Cette recherche a conduit à la compréhension et la validation des mécanismes physiopathologiques sous tendant l'action de différentes thérapeutiques tels que l'érythropoïétine, le mannitol et le lactate de sodium. Ces résultats sont essentiels afin de pouvoir aboutir à des applications dans le cadre de la recherche clinique et ainsi d'avancer dans la prise en charge thérapeutique des patients atteints de cette pathologie.

I. Introduction

A. Physiopathologie des lésions cérébrales au décours d'un traumatisme crânien : œdème cérébral post traumatique.

1. Introduction

La prise en charge des patients souffrant d'un traumatisme crânien (TC) constitue un enjeu de santé publique majeur. En effet, cette atteinte est responsable d'un taux de mortalité compris entre 20 et 52% représentant 40% de la mortalité attribuée à un traumatisme en France (Vigue and Ract 2014). Chaque année, 235000 américains sont hospitalisés pour un TC non fatal, 1.1 millions sont pris en charge dans les unités d'urgence et 50000 décèdent d'un TC grave (Corrigan, Selassie et al. 2010). Le coût annuel de la prise en charge des TC aux USA est de 10 milliards de dollars (Corrigan, Selassie et al. 2010) et de 33 milliards de dollars en Europe en 2010 (Olesen, Gustavsson et al. 2012). En Europe, l'incidence des TC est d'environ 47.3 à 694 pour 100000 personnes sur 22 pays étudiés avec 235 patients concernés pour 100000 hospitalisés et une mortalité moyenne d'environ 15 pour 100000 patients (9-28.1 patients en fonction des pays) (Tagliaferri, Compagnone et al. 2006, Olesen, Gustavsson et al. 2012, Brazinova, Rehorcikova et al. 2016). Les TC correspondent à une des premières causes de morbi-mortalité chez les jeunes en raison des différents mécanismes qui contribuent à l'installation des lésions primaires et secondaires (McArthur, Chute et al. 2004). Les facteurs de risque de TC grave sont: le sexe masculin, un âge de moins de 25 ans ou plus de 65 ans, l'implication dans des accidents de la voie publique (cycliste) (Scholten, Haagsma et al. 2014). Les causes principales de TC sont: les accidents de la circulation, les chutes et les agressions (Tagliaferri, Compagnone et al. 2006, Llompart-Pou, Chico-Fernandez et al. 2016). Les TC aux urgences impliquent plus les personnes âgées avec des comorbidités, comparativement aux populations plus jeunes chez qui le taux d'incidence reste stable voire décline légèrement (Fu, Jing et al. 2016).

Les TC ont des conséquences fonctionnelles invalidantes à long terme (convulsions, pathologies neurodégénératives, troubles du sommeil, neuroendocriniens…). Aux USA, 43% des patients présentent un handicap à 1 an

du TC et 3.2 millions d'américains présentent à ce jour des séquelles d'un TC (Corrigan, Selassie et al. 2010). Vingt pour cent des patients seulement n'auront pas de séquelles à long terme et retourneront à une vie antérieure normale (Vigue and Ract 2014) et 84% iront en service de rééducation spécialisé.

Ces lésions sont responsables d'un œdème cérébral (OC) qui, par le biais d'une élévation de la pression intracrânienne (PIC), contribue à la formation de lésions ischémiques secondaires. Deux sortes de lésions sont observées après un TC : primaires et secondaires. Les lésions cérébrales primaires, induites au moment de l'accident, peuvent être focales et/ou diffuses. Les lésions diffuses, les plus fréquentes, sont liées à des phénomènes de cisaillement au cours du TC. En effet, des lésions mécaniques du cytosquelette axonal, communément appelées lésions axonales diffuses (DAI Diffuse Axonal Injury), altèrent la fonctionnalité des axones (Vieira, Paiva et al. 2016). Elles s'observent essentiellement au niveau des zones de jonction entre la substance grise (SG) et la substance blanche (SB) (Maas, Stocchetti et al. 2008). Il se produit alors un cercle vicieux car les lésions primaires entraînent la constitution d'un OC avec augmentation de la quantité d'eau intra cérébrale (Unterberg, Stover et al. 2004). Cet œdème cérébral peut être responsable d'une Hypertension Intra Crânienne (HTIC) et entrainer une ischémie par:

- Une action directe sur la perfusion cérébrale avec: Pression de Perfusion Cérébrale (PPC) = Pression Artérielle Moyenne (PAM) - Pression Intra Crânienne (PIC)
- Un engagement cérébral en raison du caractère inextensible de la boite crânienne.

Cette ischémie cérébrale est responsable à son tour de lésions secondaires qui aggravent les lésions initiales (Payen, Fauvage et al., Traitement de l'œdème cérébral, SFAR 2001).

2. Physiopathologie

A la suite du TC surviennent des lésions focales : fractures, hématomes (intra parenchymateux ou extra/sous duraux) ou contusions hémorragiques. Elles entrainent des lésions séquellaires propres du fait d'une ischémie des territoires lésés.

Des lésions plus diffuses sont également présentes. La barrière hémato encéphalique (BHE) est une structure permettant de réguler finement les échanges entre les compartiments vasculaire et interstitiel. Elle est composée de trois structures intriquées: les cellules endothéliales, la membrane basale et les pieds astrocytaires (Kimelberg 2004). La présence de jonctions serrées (*tight junction TJ*) entre les cellules endothéliales rend la BHE imperméable à de nombreuses molécules (Figure 1).

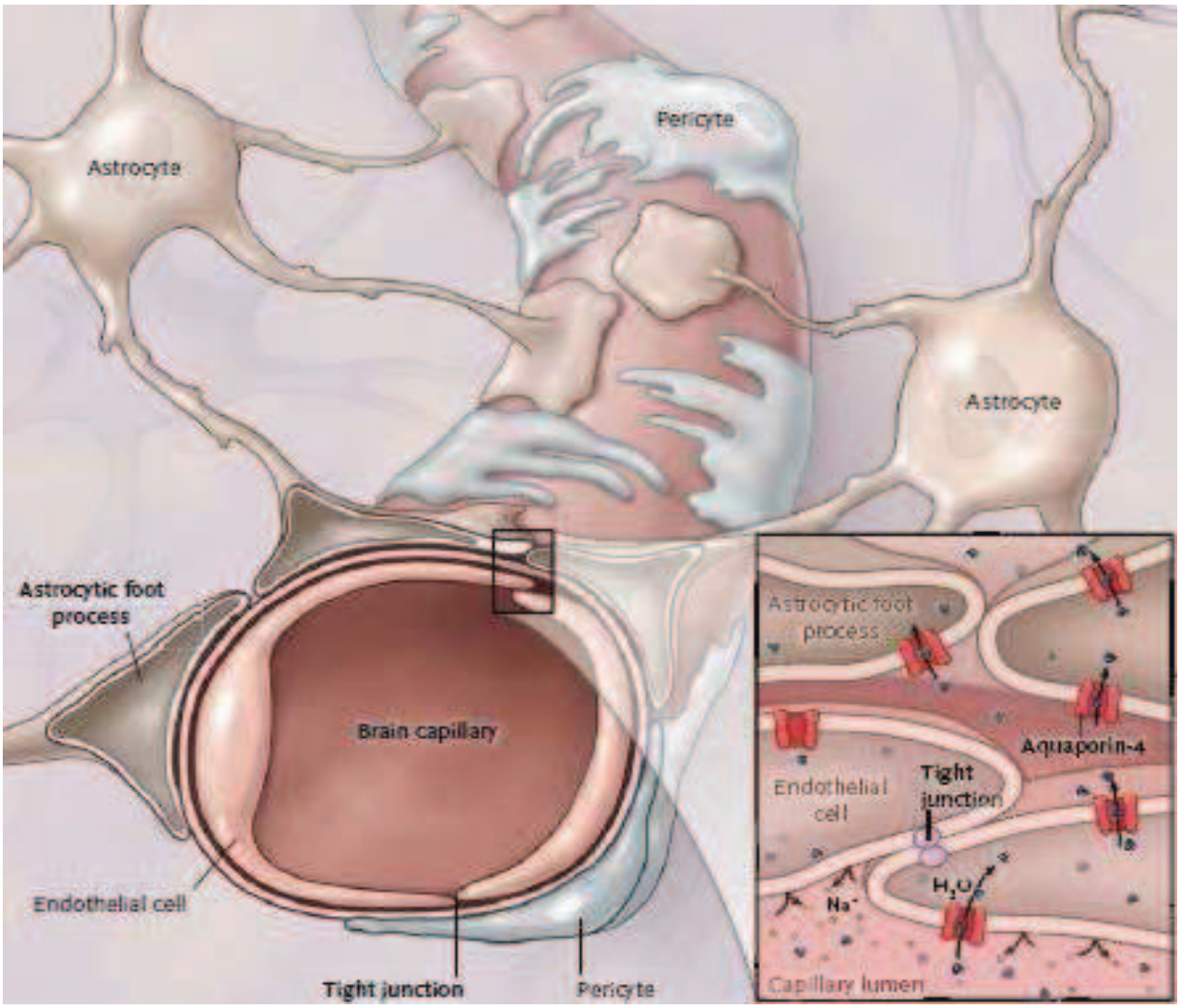


Figure 1: Barrière Hémato Encéphalique *(Sterns et al. NEJM 2015)*

L'accumulation d'eau au sein du tissu cérébral est retrouvée dans de nombreuses pathologies. Long en 1982 décrivait ainsi l'un comme un œdème cellulaire d'origine toxique ou métabolique et le second comme un œdème vasogénique interstitiel d'origine traumatique (Long 1982, Marmarou 2003, Kimelberg 2004, Unterberg, Stover et al. 2004, Donkin and Vink 2010).

a. Œdème cérébral vasogénique

Quand la BHE est suffisamment endommagée, une augmentation de sa perméabilité explique l'entrée d'eau, d'osmoles, voire de sang du secteur intravasculaire vers le secteur interstitiel (Barzo, Marmarou et al. 1997, Unterberg, Kiening et al. 1997). Cette accumulation se produit principalement au niveau de la SB de par sa compliance mécanique plus élevée. La présence de certains transporteurs/canaux au niveau des pieds astrocytaires entourant les vaisseaux permet de moduler cette entrée/sortie de molécules au travers de la BHE: les canaux ioniques, les transporteurs (glucose, lactate, phénylalanine) ou encore les aquaporines (AQP) de type 4 (Kimelberg 2004, Sterns 2015).

Plusieurs médiateurs de l'OC ont été décrits: les aquaporines (AQP) (cf paragraphe spécifique) (Papadopoulos and Verkman 2007), les MMP (Matrix MetalloProteases), la neuroinflammation, le stress oxydant et des agents vasoactifs.

Les métalloprotéases sont des endopeptidases Zinc dépendantes impliquées dans le remodelage tissulaire induit par de nombreuses pathologies. Le défaut de contrôle de leur régulation a été impliqué dans la physiopathologie de la perte synaptique et dans les lésions de la BHE post TC, post accident vasculaire cérébral (AVC) et dans les maladies neurodégénératives. Les MMP-2 3 et 9 particulièrement, sont up régulées à la suite d'un TC, entrainant une rupture de la BHE, responsable de l'OC vasogénique et de la mort cellulaire. En effet, les souris déficientes en MMP-9 sont protégées de l'ischémie, des lésions de la BHE et de l'OC avec diminution de la réponse inflammatoire. Ces souris présentaient ainsi une meilleure évolution neurodéveloppementale (Gasche, Fujimura et al. 1999). De même les inhibiteurs de MMP diminuent les lésions de la BHE, l'OC et la mort cellulaire (Candelario-Jalil, Yang et al. 2009). Le stress oxydant (SO) peut activer les MMP de la matrice susceptibles de dégrader la membrane basale et les composants de la matrice extracellulaire de la BHE (Haorah, Ramirez et al. 2007). Cependant, des effets neuroprotecteurs paradoxaux ont été décrits favorisant le remodelage neurovasculaire (Zhao, Wang et al. 2006).

Au cours du TC, il y a également précocement une réaction inflammatoire locale avec libération de nombreux médiateurs qui participent à l'ouverture de la BHE (Shigemori, Katayama et al. 2006). Celle ci est secondaire à l'infiltration des cellules sanguines, l'activation microgliale et astrocytaire. Ces cellules entrainent la sécrétion post-traumatique de médiateurs cytotoxiques de type: cytokines, interleukine-1β (Il-

1β) et le facteur nécrosant des tumeurs (TNFα). On note également une augmentation de l'expression des chimiokines, des molécules d'adhésion et d'enzymes pro-inflammatoires (Morganti-Kossmann, Satgunaseelan et al. 2007). La famille des kinines et notamment la bradykinine est fortement impliquée dans ces lésions (Plesnila, Schulz et al. 2001). Les bradykinines sont des peptides actifs issus du clivage de la kininogène par les kallicréines. Elles agissent sur deux récepteurs de type B1 et B2 uprégulés dans les 24H suivant un TC chez la souris. Le récepteur B2 semble avoir le plus de poids dans la genèse de l'œdème cérébral (Plesnila, Schulz et al. 2001, Ker and Blackhall 2008, Zweckberger and Plesnila 2009). Les tachykinines sont des peptides impliqués dans l'inflammation neurogénique qui regroupe des effets vasodilatateur, d'extravasation plasmatique et de sensitivation neuronale avec relargage de neuropeptides. L'élévation de la substance P au niveau périvasculaire serait impliquée dans la formation de l'OC dans un modèle de TC diffus chez le rat et en traumatologie humaine (Donkin, Nimmo et al. 2009). Une autre cascade de médiateurs inflammatoires initiée par les cellules endothéliales intervient également: cytokines (Il-1, Il-6, Il-8, TNF) et molécules solubles d'adhésion leucocytaire (ICAM-1). L'extravasation de cellules inflammatoires (macrophages, leucocytes...) permet alors la pérennisation de l'inflammation locale.

Le SO a également un effet pro inflammatoire. Les radicaux libres (RLs) (Kilbaugh, Lvova et al. 2015) sont produits principalement lors de la respiration et du métabolisme cellulaire par les mitochondries, à partir des phospholipides membranaires, par l'activation des monoamines oxydases (MAO), des cyclo-oxygénases (COX), des NO synthases (NOS) (Manley, Fujimura et al. 2000) et par des cellules inflammatoires (macrophages, polynucléaires neutrophiles...).

Le monoxyde d'azote (NO), produit massivement par les NOS (Manley, Fujimura et al. 2000), peut se combiner aux anions superoxydes (O2-) pour former des anions peroxynitrites (ONOO-), qui sont de puissants agents du stress oxydant.

L'ensemble de ces phénomènes conduit au défaut de perméabilité de la BHE par destruction des jonctions serrées avec OC vasogénique (Payen, Fauvage et al. 2003).

b. Œdème cérébral cytotoxique

L'œdème cérébral à prédominance cellulaire, ou cytotoxique, correspond à une accumulation d'eau intracellulaire au sein des astrocytes majoritairement (Chen and Swanson 2003, Unterberg, Stover et al. 2004) (Figure 2).

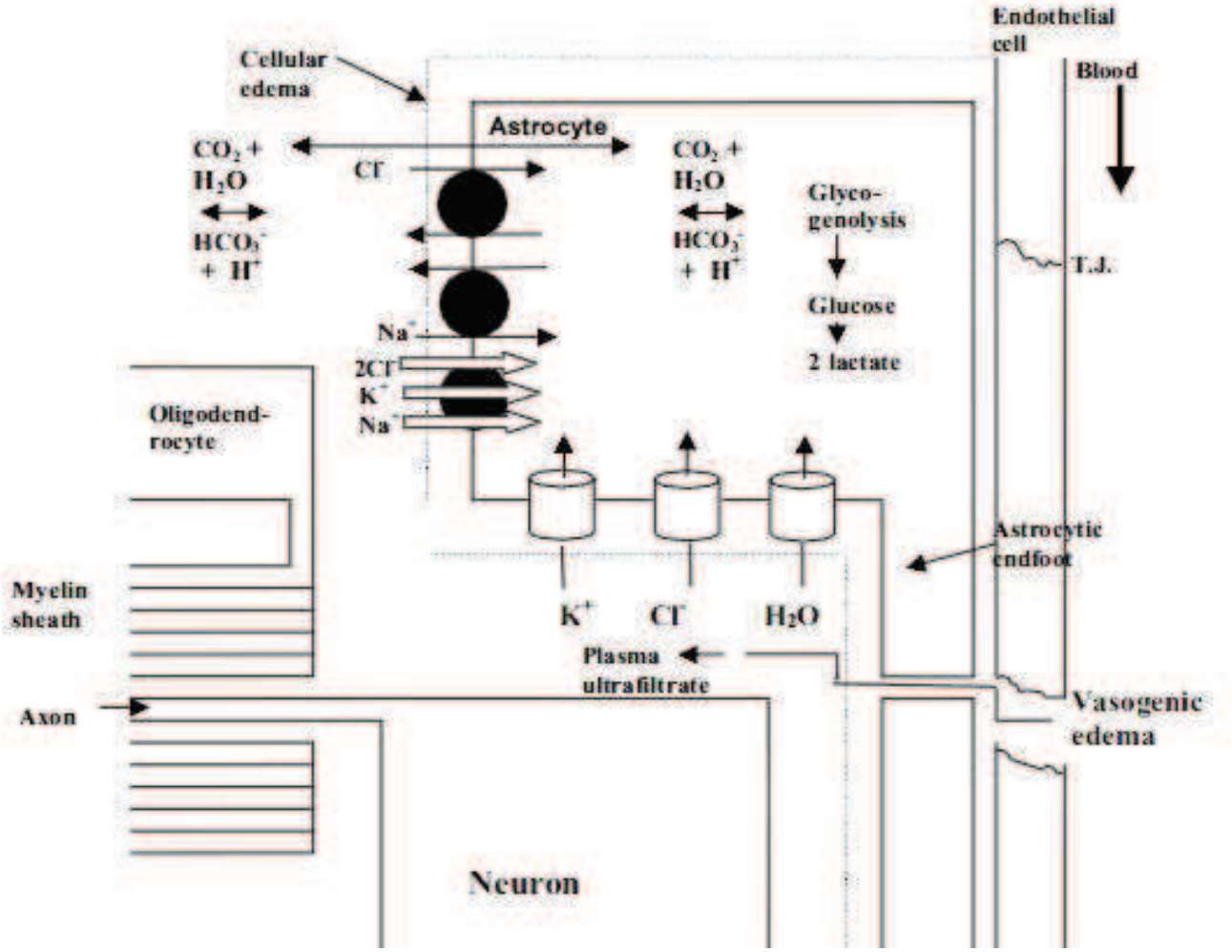


Figure 2: Deux types d'œdème cérébral *(Kimelberg et al. Neuroscience, 2004; modifié de Kimelberg et al. JNS 1995).*

Ce gonflement cellulaire peut concerner cependant l'ensemble des éléments cellulaires: neurones, cellules gliales et cellules endothéliales, aboutissant à une défaillance énergétique de ces cellules. Son apparition débute au niveau des pieds astrocytaires (Chen and Swanson 2003) à BHE intègre. Il est lié à des mouvements ioniques du compartiment extracellulaire vers l'intracellulaire faisant osmotiquement un appel d'eau passif grâce aux AQP membranaires. Ces mouvements se produisent en rapport avec une excitotoxicité induite par le Glutamate, libéré en excès lors d'un TC, qui entraîne l'afflux de Na^+, Cl^- , H^+ et de Ca^{2+} dans la cellule. Le défaut des pompes présynaptiques et l'exocytose mise en jeu par le Ca^{2+} contribuent à la

libération initiale de glutamate dépendante de la dépolarisation neuronale. Ces excès ioniques ne peuvent être compensés indéfiniment par les pompes actives (Na/K ATPase) en raison d'une défaillance de production énergétique (dysfonction mitochondriale...). La production de radicaux libres par l'excès de Ca2+ cellulaire aggrave ces phénomènes de même que la fragmentation de macromolécules de glycogène au sein des astrocytes (Kimelberg 2004, Unterberg, Stover et al. 2004).

Cette défaillance énergétique cellulaire conduit ainsi à de multiples évènements cellulaires (Kimelberg 2004):

- Une dépolarisation membranaire due à la perte de K^+ intracellulaire conduisant à des entrées massives de Ca^{2+} via les canaux voltages dépendants.
- Une recapture intracellulaire astrocytaire de K+ quand la concentration extracellulaire est trop élevée, mécanisme compensateur initial.
- Une glycolyse anaérobie avec augmentation de la production d'acide lactique aboutissant à une acidose intracellulaire (Andersen and Marmarou 1992); cette acidose entraîne l'activation de transporteurs anioniques participant également à l'élévation de la charge osmotique intracellulaire (Ringel, Chang et al. 2000).

c. Aquaporines (AQP)

Les AQP constituent des protéines membranaires véritables « pores » perméables aux molécules d'eau dans les membranes biologiques selon les gradients osmotiques. Au moins 13 protéines ont été identifiées chez les mammifères (Verkman 2009). On distingue deux groupes d'AQP: celles qui ne transportent que de l'eau et celles qui transportent également du glycérol et d'autres petites molécules telle l'acide lactique que l'on nomme aquaglycéroporines (AQP3, 7 et 9). Au niveau cérébral, l'AQP la plus abondante est l'AQP4 située au niveau des pieds astrocytaires autour des microvaisseaux, au niveau de la pie-mère et au niveau épendymaire (Papadopoulos and Verkman 2007). Le rôle bénéfique ou délétère des AQP dans la genèse de l'œdème cérébral est encore discuté.

Certains auteurs décrivent un effet favorisant l'entrée d'eau intra cellulaire avec surexpression des AQP4 dans les suites de lésions cérébrales non traumatiques ou traumatiques chez le rat et chez l'homme (Ding, Kreipke et al. 2009). Chez des rongeurs KO pour l'AQP4 ou après admnistration d'un inhibiteur des AQP4, on note une diminution de cet œdème après ischémie cérébrale (Manley,

Fujimura et al. 2000, Fazzina, Amorini et al. 2010). Dans un modèle de TC par impact-accélération chez des rats, l'inhibition post-traumatique de l'AQP-4 et -9 par des anticorps spécifiques diminuait l'OC et les dommages neuronaux 24H après le TC et permettait une amélioration neurocomportementale (Shenaq, Kassem et al. 2012). D'autres auteurs décrivent a contrario un rôle bénéfique des AQ4 au niveau cérébral avec "épuration" de l'eau intra cellulaire après un premier effet inducteur d'œdème cérébral (Hirt, Ternon et al. 2009).

d. Méthodes d'évaluation de l'œdème cérébral

IRM: Etude du coefficient apparent de diffusion de l'eau

L'imagerie de diffusion permet d'étudier les mouvements browniens des protons, principalement contenus dans les molécules d'eau, à l'intérieur des voxels. La présence des protéines et des membranes cellulaires dans le parenchyme cérébral gêne ces mouvements aléatoires. Lors de l'apparition d'un OC cytotoxique, la proportion de l'eau intracellulaire augmente alors que celle de l'eau présente dans le secteur interstitiel diminue. La diminution de l'espace interstitiel entraîne donc une diminution des mouvements browniens de l'eau extracellulaire qui est responsable d'un hypersignal en diffusion ainsi qu'une baisse du Coefficient de Diffusion Apparent (ADC). A l'inverse dans l'œdème vasogénique secondaire à la rupture de la BHE, la diffusion des molécules d'eau est augmentée par le gonflement des espaces extracellulaires et donc l'ADC est augmenté (Ito, Marmarou et al. 1996, Barzo, Marmarou et al. 1997, Marmarou, Signoretti et al. 2006).

Ces deux mécanismes d'œdème sont intriqués de manière complexe. Marmarou *et al.* ont pu montrer que l'œdème post-traumatique n'était pas lié à une augmentation du volume sanguin cérébral (VSC) mais à une augmentation du contenu en eau du cerveau (Marmarou, Fatouros et al. 2000). La diminution du VSC était liée à celle du débit sanguin cérébral (DSC). Une des premières hypothèses serait que dans les premières heures suivant le TC prédomine un œdème vasogénique, puis apparait un OC cytotoxique qui peut perdurer jusque 15j après le TC (Donkin and Vink 2010) selon un mécanisme temps-dépendant. Ainsi, des mesures séquentielles IRM ont retrouvé un œdème vasogénique avec élévation de l'ADC 30min après un TC, lié à une ouverture réversible de la BHE, suivie d'un œdème cytotoxique avec diminution de l'ADC jusqu'à 7j après le TC (Barzo,

Marmarou et al. 1997). La diminution des ADC atteignait une valeur minimale entre J7-14 après le TC alors que le contenu en eau continuait d'augmenter jusqu'à H24.

D'autres auteurs ne décrivent pas cette ouverture de la BHE ou la décrivent survenant plus tardivement entre H1-24 post TC (Hellal, Bonnefont-Rousselot et al. 2004). Aucun franchissement de la BHE par un traceur intravasculaire dans les suites d'un TC diffus expérimental n'a été observé, traduisant ainsi le maintien de l'intégrité de la BHE (Beaumont, Fatouros et al. 2006). L'équipe de Marmarou retrouve une prédominance de l'œdème cellulaire chez des patients traumatisés crâniens au cours d'un TC focal ou diffus (Marmarou, Portella et al. 2000, Marmarou, Signoretti et al. 2006). Similairement, une baisse de l'ADC après traumatisme crânien diffus a été retrouvée par notre équipe (Verdonck, Lahrech et al. 2007, Bouzat, Francony et al. 2011) ou dans des modèles de TC diffus similaires (Ito, Marmarou et al. 1996).

Des résultats contradictoires sont mis en avant par d'autres équipes. En effet Goetz et al. observent, de manière tardive, une augmentation des ADC dans les suites d'un TC (Goetz, Blamire et al. 2004). Cette augmentation des ADC est expliquée par les destructions neuronales augmentant la diffusivité de l'eau interstitielle. Ces résultats pourraient expliquer la disparité des résultats cliniques en imagerie de diffusion et la constatation de résultats mixtes par Shaefer et al. (64% des patients avec baisse des ADC et 34% avec une augmentation) chez 116 patients présentant un TC diffus (Schaefer, Huisman et al. 2004).

Microscopie électronique

Concernant la microscopie électronique à transmission, le faisceau d'électrons est accéléré par une anode par rapport à la cathode, concentré par des lentilles électrostatiques et électromagnétiques, et transmis sur la cible qui est en partie transparente pour les électrons et en partie les disperse. Quand il ressort de l'échantillon, le faisceau d'électrons comporte des informations sur la structure de l'échantillon qui sont amplifiées par le système de lentilles de l'objectif du microscope. La variation spatiale de cette information (l '«image») est vue par projection de l'image électronique agrandie sur un scintillateur, tels que le sulfure de zinc ou le phosphore. L'image est enregistrée grâce à un couplage à une fibre optique vers le capteur d'une caméra CCD (Charge-Coupled Device). L'image

détectée par le CCD est affichée alors vers un ordinateur. La caractérisation de l'OC en microscopie électronique permet de déterminer la localisation préférentielle de cet œdème au cours de différentes pathologies. Yao et al. ont retrouvé une diminution de l'œdème cérébral astrocytaire péri capillaire chez des rats AQ4 KO au décours d'un TC focal avec intégrité de la BHE traduisant un mécanisme d'œdème cytotoxique pur (Yao, Uchida et al. 2015). Ainsi, cette méthode d'évaluation a permis d'évaluer les effets de différents traitements anti oedémateux (Donkin, Nimmo et al. 2009, Wang, Jiang et al. 2011).

Gravimétrie tissulaire

Des prélèvements de cerveau frais sont effectués afin de les immerger dans une colonne liquidienne étalonnée (mélange kerosène-bromobenzène). La spécificité gravimétrique (SpGv) du prélèvement correspond à sa hauteur au sein de la colonne. Le contenu en eau en pourcentage (% H2O) est ensuite obtenu par ces formules :

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

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

Méthode poids frais, poids sec

On effectue la mesure du poids d'un pélèvement cérébral frais puis séché à 90°C jusqu'à un poids constant. On obtient ensuite le contenu en eau (CEI) du prélèvement: CEI = 100 x (poids frais-poids sec)/poids frais.

3. Conclusion

Un œdème cérébral vasogénique et/ou cellulaire peut survenir après un TC et être responsable d'une altération de la perfusion cérébrale par augmentation de la PIC. Des thérapeutiques anti-oedémateuses sont donc utilisées pour diminuer cette PIC. Cependant, l'œdème cérébral post-traumatique n'est qu'un volet parmi les autres atteintes qui rendent le tissu cérébral vulnérable après un traumatisme. Il a été décrit en effet une hypoxie cérébrale, une dysfonction mitochondriale et des troubles du métabolisme cérébral en post-traumatique.

B. Hypoxie cérébrale post traumatique

1. Généralités

Les patients atteints d'un TC sont traités de manière à optimiser les Agressions Cérébrales Systémiques d'Origine Secondaires (ACSOS) qui risquent d'aggraver les lésions primaires induites par le TC (hypotension, hypocapnie, hyperthermie...). Le monitorage de la PIC, via un capteur ventriculaire ou intraparenchymateux, est un des premiers moyens permettant d'évaluer une situation globale de vascularisation. Elle permet le monitorage de la PPC, déterminant principal du DSC. Ce monitorage est cependant peu sensible pour détecter des épisodes d'ischémie focale, impliqués aussi dans le pronostic des patients (Coles, Fryer et al. 2004). La Pression tissulaire cérébrale en oxygène (PtiO2) est une mesure locale dont le monitorage permet de détecter une baisse des apports en O2 et/ou une diminution du DSC. Elle correspond à un reflet du contenu tissulaire en oxygène qui représente la différence entre la quantité d'oxygène ayant traversé la BHE et l'O2 utilisé par le métabolisme. Des études ont montré que des épisodes d'hypoxie cérébrale (PtiO2 < 15 mmHg) peuvent survenir chez des patients ayant un contrôle de la PIC et une PPC optimisés. Ces épisodes d'hypoxie sont associés à un mauvais devenir neurologique (Chang, Youn et al. 2009, Oddo, Levine et al. 2011). Cette hypoxie cérébrale survient lorsque les apports en oxygène sont insuffisants par rapport aux besoins du tissu.

L'oxygénation cérébrale est sous la dépendance de nombreux paramètres macro, microvasculaire et métabolique. Cruz et al. dès 1993 ont montré l'importance d'un monitorage de l'oxygénation cérébrale (Cruz, Raps et al. 1993). Van Santbrink et Kiening ont évalué dès 1996 la bonne tolérance du dispositif et la sensibilité de la PtiO2 à détecter des épisodes d'ischémie cérébrale avec hypoxie secondaire (Kiening, Unterberg et al. 1996, van Santbrink, Maas et al. 1996). Un traitement agressif des épisodes d'hypoxie cérébrale est associé à une meilleure évolution neurologique chez des patients traumatisés crâniens comparé à la prise en charge standardisée du maintien de la PPC (Stiefel, Spiotta et al. 2005, Narotam, Morrison et al. 2009, Purins, Lewen et al. 2014). C'est pourquoi actuellement la détection précoce de ces épisodes d'hypoxie cérébrale par un monitorage multimodal constitue

un enjeu majeur du traitement des patients cérébro lésés (Zauner, Daugherty et al. 2002, Adamides, Cooper et al. 2009, McCarthy, Moncrief et al. 2009). Le développement de techniques d'évaluation de l'oxygénation tissulaire cérébrale apparait donc comme primordial dans le cadre de la gestion des patients atteints de TC en clinique afin d'améliorer leur morbimortalité.

2. Paramètres de l'oxygénation

PaO2

La consommation cérébrale en O2 (CMRO2) est sous la dépendance, entre autres, de l'apport systémique en oxygène aux tissus par la PaO2 et l'hémoglobine avec:

CMRO2 = CBF x 1,34 x Hb x (SaO2-SvO2)

où

Hb = Hémoglobine; CBF = Cerebral Blood Flow

OEF= Oxygen Extraction Fraction = (SaO2-SVO2)/SaO2

On comprend que tout trouble du DSC (macrovasculaire), de la diffusion en oxygène (microvasculaire) ou toute élévation de la demande métabolique (élévation de l'OEF) ou toute dysfonction mitochondriale vont modifier la CMRO2.

Approche macrovasculaire

Une ischémie cérébrale post traumatique en lien avec une diminution de la PPC sur élévation de la PIC est une des principales causes de diminution de l'oxygénation cérébrale. Un seuil de PPC inférieur à 60 mm Hg est associé à la survenue d'une hypoxie cérébrale (Unterberg, Kiening et al. 1997). Cette ischémie survient dans les premières heures post-traumatiques et est liée au pronostic neurologique des patients (Bouma and Muizelaar 1992). Le cerveau traumatisé semble plus sensible à l'hypoxie que le cerveau lésé dans les suites d'une ischémie. Ainsi, les seuils critiques d'oxygénation cérébrale admis à la suite d'un AVC sont plus élevés en cas de TC (Cunningham, Salvador et al. 2005). Des facteurs systémiques influencent également la macrocirculation cérébrale et sont à l'origine d'une

diminution du DSC tout comme l'hypocapnie (Coles, Minhas et al. 2002). L'extension des zones ischémiques est corrélée à l'intensité de l'HTIC (Graham, Adams et al. 1978). Cette hypoxie tissulaire d'origine ischémique peut donc être limitée par le contrôle de la PIC et le maintien de la PPC (Bratton, Chestnut et al. 2007). Cependant, du fait d'une inhomogénéité de perfusion cérébrale, le maintien d'une PPC adéquate ne suffit pas à empêcher des zones d'hypoperfusions focalisées détectées par tomographie par émissions de positrons (TEP) chez des patients traumatisés ayant une hémodynamique stable (Coles, Fryer et al. 2004). Actuellement, les thérapeutiques visent à assurer un niveau de PPC optimal individualisé pour chaque patient en tenant compte des données multimodales du DTC, du monitorage de l'oxygénation (Prabhakar, Sandhu et al. 2014).

Approche microvasculaire

Des phénomènes microvasculaires sont à l'origine d'une hypoxie cérébrale (Dietrich, Alonso et al. 1994, Vaz, Sarmento et al. 1997, Rodriguez-Baeza, Reina-de la Torre et al. 2003). En effet, après un TC, un œdème des pieds astrocytaires péri vasculaire va diminuer l'apport en O2 systémique aux tissus du fait i) de la compression vasculaire avec formation de microthrombis et ii) de troubles de la diffusion en oxygène en augmentant la distance entre le vaisseau et la cellule (Menon, Coles et al. 2004) (Figure 3).

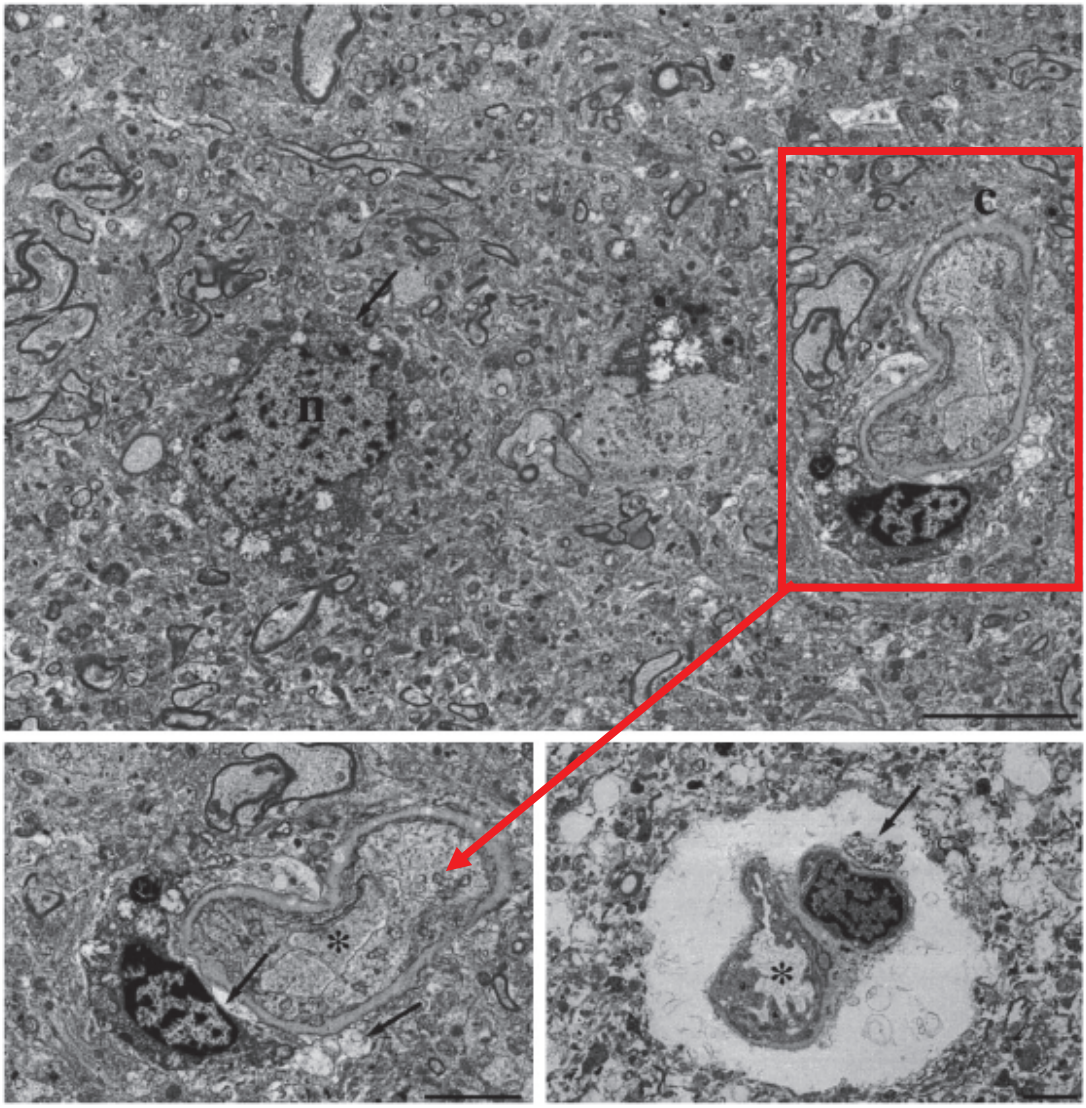


Figure 3: Capillaire collabé après TC avec image d'œdème périvasculaire *(Menon et al. CCM 2004)*

Approche métabolique

Le TC est à l'origine d'une cascade excito toxique et inflammatoire complexe. Si la CMRO2 reste constante, les changements dans la DAVO2 reflètent ainsi un changement dans le CBF (Robertson, Narayan et al. 1989). Initialement, la CMRO2 semble maintenue dans la zone de pénombre du TC, malgré la baisse du CBF, par une élévation de l'OEF jusque plus de 70% chez des patients traumatisés crâniens, pour une normale d'OEF autour de 30-40%, avec élévation de la consommation cérébrale en glucose (Abate, Trivedi et al. 2008). En effet, en raison de la survenue d'une crise hyperglycolytique post traumatique, le métabolisme cérébral peut augmenter sans augmentation suffisante du DSC. Ceci est à l'origine d'une élévation

de l'OEF et d'une inadéquation entre les besoins en oxygène du tissu cérébral et les apports (Enriquez and Bullock 2004).

En revanche, l'OEF semble diminuer, malgré une diminution du DSC, lorsque les tissus sont incapables d'utiliser l'oxygène extrait soit par des troubles de la diffusion en O2 soit par une destruction cellulaire avec dysfonction de la phosphorylation oxydative (Cunningham, Salvador et al. 2005). Cette baisse d'OEF malgré la baisse du DSC, entraine une baisse de la CMRO2. Ceci a été confirmé lors d'études cliniques de patients traumatisés crâniens de manière prolongée, jusque J7 post TC (Glenn, Kelly et al. 2003). Salvant et Muizelaar ont suggéré au cours d'un TC avec hématome sous dural, qu'une diminution du métabolisme était en lien avec une diminution du DSC et de la CMRO2 sans augmentation de l'OEF en rapport avec une dysfonction mitochondriale (Salvant and Muizelaar 1993).

En résumé, quand le DSC chute après un TC, l'OEF va augmenter pour compenser (Diringer, Videen et al. 2002) mais si cette compensation est insuffisante en raison d'une destruction cellulaire ou d'une dysfonction mitochondriale ou de troubles de la diffusion en O2, la CMRO2 va diminuer. Cette altération du métabolisme cérébral oxydatif survient précocement (J15 post TC) et a un impact sur le pronostic neurologique des patients (Jaggi, Obrist et al. 1990).

3. Méthodes d'évaluation de l'oxygénation

Seules les mesures utilisées dans les études réalisées sont détaillées dans ce paragraphe.

Mesure de la pression tissulaire en oxygène

La PtiO2 mesure la pression partielle de l'oxygène dissous dans un volume de quelques mm3 constitués de liquide extra-cellulaire, de capillaires, de cellules cérébrales et d'axones. Une des hypothèses concernant le rôle de la PtiO2 serait qu'il s'agit d'un reflet de l'oxygène disponible pour la phosphorylation oxydative de la chaîne respiratoire mitochondriale. Elle représenterait une balance entre apport et consommation en oxygène dans le tissu cérébral et serait sous la dépendance des caractéristiques macro/microvasculaires du tissu et de la diffusion en O2 (Menon, Coles et al. 2004, Nortje and Gupta 2006). Rosenthal et al. proposent que la PtiO2

représente plutôt le reflet de la diffusion en oxygène du capillaire vers le tissu cérébral plutôt que le reflet de l'équilibre entre l'apport d'oxygène systémique et son utilisation tissulaire (Rosenthal, Hemphill et al. 2008). Son monitorage permet de détecter une baisse des apports en O2 et/ou une diminution du DSC selon une approche focale.

La PtiO2 est mesurée à l'aide d'une sonde ayant une électrode de Clark implantée dans le parenchyme cérébral ou par mesure optique. La première permet la diffusion des molécules d'oxygène qui sont réduites par une cathode polarographique à travers une membrane dans une solution électrolytique qui entraîne l'apparition d'un courant électrique proportionnel à la concentration en O2. Dans la deuxième, l'O2 induit des réactions photochimiques et modifie ainsi les propriétés optiques d'une source lumineuse (Beynon, Kiening et al. 2012). Le système majoritairement disponible est l'électrode de Clark (sonde Licox). Après positionnement, une période d'équilibration de quelques heures est nécessaire. La zone d'insertion au sein du parenchyme cérébral fait débat et sa proximité locale avec différentes structures modifient son interprétation (Scheufler, Rohrborn et al. 2002). L'implantation en zone saine dans la SB du lobe frontal droit représenterait un indice global d'oxygénation cérébrale, alors que l'implantation en zone péri contuse permettrait de mieux guider localement la neuroréanimation. La comparaison de ces valeurs peut avoir un intérêt thérapeutique de même que le suivi de la PtiO2 au sein des zones contuses afin d'évaluer la récupération d'une microvascularisation plus fonctionnelle (Longhi, Pagan et al. 2007). La PtiO2 varie donc avec la PPC, le DSC, la PCO2, la PO2, l'hémoglobine et la CMRO2.

Les seuils ischémiques ont été définis en fonction du devenir neurologique en comparant PtiO2 et DSC (Doppenberg, Zauner et al. 1998, Menzel, Doppenberg et al. 1999) ou PtiO2 et SvjO2 (Kiening, Unterberg et al. 1996). Le seuil critique admis pour définir une ischémie cérébrale à partir de la PtiO2 est classiquement autour de 10 mmHg, seuil assez bas physiologiquement (Scheufler, Rohrborn et al. 2002). Les seuils ont donc été élevés par de nombreuses équipes à 15-20 mm Hg pour limiter les risques liés à la zone intermédiaire comprise entre 10-20 mm Hg (Johnston, Steiner et al. 2005). La PtiO2 est un facteur pronostic important dans l'évolution des patients atteints de TC (Chang, Youn et al. 2009, Spiotta, Stiefel et al. 2010, Oddo, Levine et al. 2011) (Figure 4).

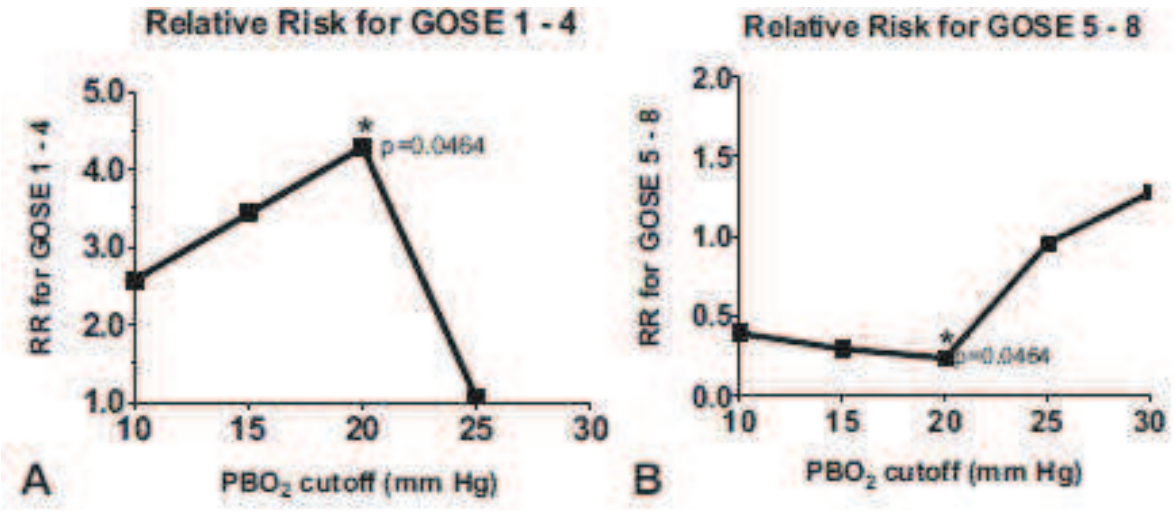


Figure 4:
A et B: Graphiques montrant le risque relatif d'avoir un score GOSE de 1-4 et de 5-8 (Glasgow Outcome Score Extended) pour des patients ayant subi un TC avec plus de 20% de temps d'épisodes hypoxiques sous différents seuils de PtiO2 *(Chang et al. CCM 2009)*

IRM multiparamétrique et effet BOLD

En bolus, l'injection systémique d'un produit de contraste possédant une forte susceptibilité magnétique dégrade le signal lors de son passage dans le plan de coupe par augmentation de l'hétérogénéité de champ. Après traitement du signal, l'IRM de perfusion permet d'extrapoler des paramètres de perfusion microcirculatoire comme le temps de transit moyen (TTM) et le DSC exprimé en ml/mn/100 g de tissu. Les séquences de perfusion à l'équilibre permettent quant à elles de calculer le VSC (Luypaert, Boujraf et al. 2001).

La mesure de l'oxygénation cérébrale par IRM repose sur la quantification de l'effet BOLD (Blood Oxygen Level Dependent) (Christen, Lemasson et al. 2011), qui exprime localement le rapport entre l'oxyhémoglobine et la désoxyhémoglobine (Figure 5). Cette dernière est un agent paramagnétique qui crée des inhomogénéités locales dans le champ magnétique. On peut ainsi approcher la quantité de désoxyhémoglobine au sein du voxel en combinant des séquences pondérées en T2 et en T2* (Spees, Yablonskiy et al. 2001). En effet, la différence entre ces deux mesures repose principalement sur l'absence de rephasage dans la séquence T2* qui la rend sensible aux inhomogénéités de champ magnétique dans les tissus. Cette propriété est couramment utilisée en IRM pour diagnostiquer les lésions axonales diffuses hémorragiques qui sont millimétriques mais apparaissent visibles par un hypo signal en T2* (après correction des inhomogénéités macroscopiques de champ magnétique) grâce aux propriétés paramagnétiques de la

désoxyhémoglobine. L'effet BOLD est de plus à la base de l'IRM fonctionnelle (IRMf) qui suit l'évolution au cours d'une activité cérébrale volontaire des rapports entre oxy et désoxyhémoglobine et permet de localiser les régions motrices fonctionnelles essentielles à la fonction testées (vision, langage, motricité).

La combinaison de cet effet BOLD avec les cartographies quantitatives du VSC (grâce à l'injection d'un produit de contraste superparamagnétique à l'équilibre) permet de déterminer la saturation locale en oxygène (ISO2) grâce à la formule :

ISO2= 1 - (4/3.γ.π.Δχ0.Bo.Hte.T2'.VSC)-1

Avec :

- 1/T2' = 1/T2* - 1/T2
- Δχ0= 0,264 ppm = différence entre la susceptibilité magnétique de l'hémoglobine totalement oxygénée et totalement désoxygénée.
- Hte = Taux d'hématocrite
- γ = Rapport gyromagnétique
- B0 = 4,7 T

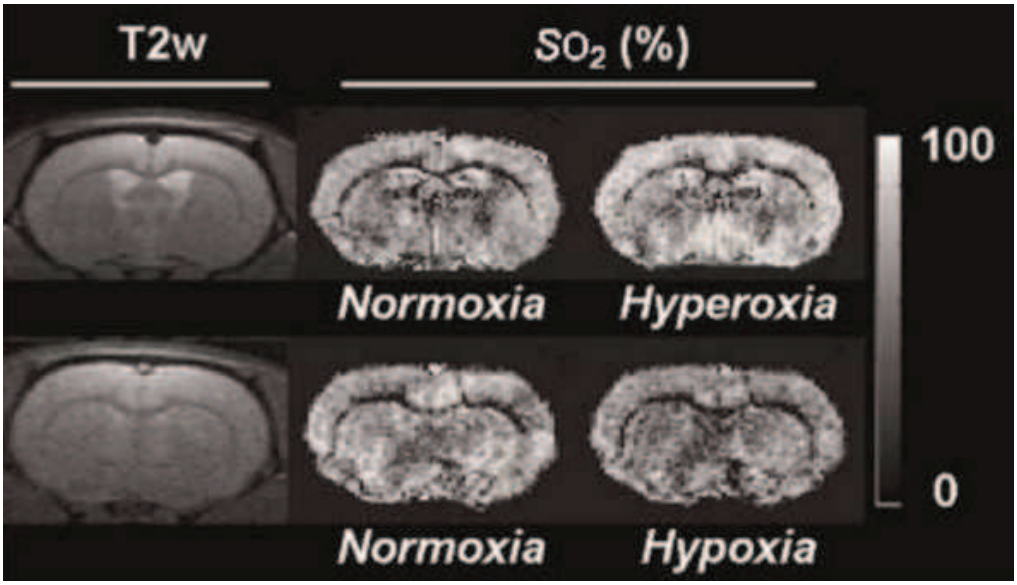


Figure 5 : Cartographies d'images pondérées T2 et de ISO2 dans les conditions testées : normoxie, hypoxie, hyperoxie (*Christen et al NMR Biomed 2011*)

Autres mesures

Mesure de la saturation en O2 du sinus veineux longitudinal supérieur, Mesure de la saturation veineuse jugulaire en oxygène, NIRS, Résonance paramagnétique électronique, Marqueurs histologiques de l'hypoxie, Tomographie photoaccoustique, Mesure de la CMRO2, IRM 17O, TEP 15O, IRMf quantitative…

4. Conclusion

L'hypoxie cérébrale post-traumatique est ainsi d'origine pluri factorielle, sous la dépendance des caractéristiques macro/microvasculaires du tissu et du métabolisme cérébral. On comprend que des thérapeutiques améliorant une/plusieurs de ces caractéristiques vont permettre d'améliorer l'hypoxie cérébrale post TC.

L'évaluation de l'oxygénation tissulaire cérébrale apparaît donc comme essentielle actuellement dans le cadre de la prise en charge des patients cérébrolésés. En effet, de par cette dépendance de plusieurs facteurs, elle apporte des informations supplémentaires au monitorage standard PPC/PIC et permet d'améliorer le devenir des patients.

La dysfonction mitochondriale est un autre volet des différentes lésions survenant au décours d'un TC.

C. Dysfonction mitochondriale post traumatique

1. Introduction

Un dysfonctionnement mitochondrial a été décrit ces dernières années suite à l'excito toxicité, l'accumulation de calcium, le stress oxydatif et l'inflammation locale survenants au décours d'un TC (Galluzzi, Blomgren et al. 2009). Un dépassement des capacités de résistance de la mitochondrie est décrit, provoquant l'ouverture d'un pore mitochondrial transmembranaire, le mPTP (mitochondrial permeability transition pore), entrainant un œdème osmotique et une apoptose cellulaire. De même, une défaillance de la chaine respiratoire mitochondriale est observée après un TC. Ainsi les thérapeutiques qui agissent sur cette dysfonction semblent prometteuses en termes d'amélioration du pronostic des patients (Gajavelli, Sinha et al. 2015).

La mitochondrie est un organite cellulaire d'environ 2 à 10 µm de longueur et de 0,5 à 1 µm de largeur. Elle se compose de deux membranes, une externe et une interne, qui délimitent trois milieux qui sont le milieu extramitochondrial (cytoplasme de la cellule), l'espace inter-membranaire et la matrice. La membrane externe mitochondriale est une membrane formée de 60 % de protéines et de 40 % de lipides polaires. La porine (protéine transmembranaire) laisse passer toutes les molécules hydrophiles de poids moléculaire inférieur à 5 kDa. Les molécules de plus haut poids moléculaire peuvent entrer par la membrane externe uniquement sous certaines conditions. La rupture de la membrane externe dans des conditions pathologiques libère des facteurs pro-apoptotiques entrainant la mort cellulaire programmée ou non. La membrane interne est composée de 75 % de protéines et de 25 % de lipides. Elle a une perméabilité sélective. Certaines molécules neutres (O2, eau, CO2, NH3...) peuvent diffuser passivement mais de nombreux ions et autres molécules utilisent un transporteur spécifique pour traverser cette membrane, fournissant ainsi à la mitochondrie des substrats et enzymes de la chaine respiratoire. De multiples invaginations de la membrane interne ou crêtes mitochondriales augmentent la surface d'échange de la membrane et permettent de multiplier les unités fonctionnelles de la chaine respiratoire. Cette membrane interne comporte un pore appelé le pore de perméabilité mitochondrial transmembranaire ou

mPTP. La matrice elle comporte: des enzymes nécessaires a l'oxydation du pyruvate et des acides gras et celles du cycle de Krebs, des copies identiques du génome mitochondrial, des ribosomes mitochondriaux, des ARNt (Acide ribonucléique de transfert) et différents enzymes nécessaires à l'expression des gènes mitochondriaux (Benard and Rossignol 2008).

2. Fonctions mitochondriales

Synthèse ATP ou respiration mitochondriale

La phosphorylation oxydative permet l'oxydation des nutriments par l'O2 libérant une quantité importante d'énergie stockée sous forme de liaison d'une liaison anhydre lors de la phosphorylation de l'adénosine diphosphate (ADP) en adénosine triphosphate (ATP). Les combustibles utilisés pour produire de l'ATP sont les produits de la glycolyse, les acides gras, les corps cétoniques, et certains acides aminés. Trois étapes sont nécessaires pour cette respiration cellulaire:

- *Formation de coenzymes réduits donneurs de protons stockés dans la matrice* après oxydation des combustibles et le cycle de Krebs
- *Transport des électrons des coenzymes réduits à l'O2 moléculaire le long de la chaine respiratoire* par les 4 complexes de la chaine respiratoire mitochondriale et par deux navettes (Ubiquinone et cytochrome c), auquel est couplé le transport actif de protons vers l'espace inter membranaire, créant une différence de potentiel électrochimique transmembranaire et un gradient de pH. Le flux d'électrons provenant du NADH matriciel est pris en charge successivement par le complexe I (NADH/ubiquinone reductase), l'ubiquinone (UQ), le complexe III (ubiquinone/cytochrome c reductase), le cytochrome c, le complexe IV (cytochrome c oxydase), et enfin l'oxygène moléculaire. Le flux d'électrons en provenance du FADH2 suit le trajet : complexe II (succinate/ubiquinone-reductase), UQ, complexe III, cytochrome c, complexe IV, et enfin l'oxygène moléculaire (Figure 6). Dans les conditions physiologiques, une quantité très faible de l'O2 est incomplètement réduite au niveau des complexes I et III et donne ainsi naissance à des espèces radicalaires, qui ont des rôles importants de second messager intracellulaire.

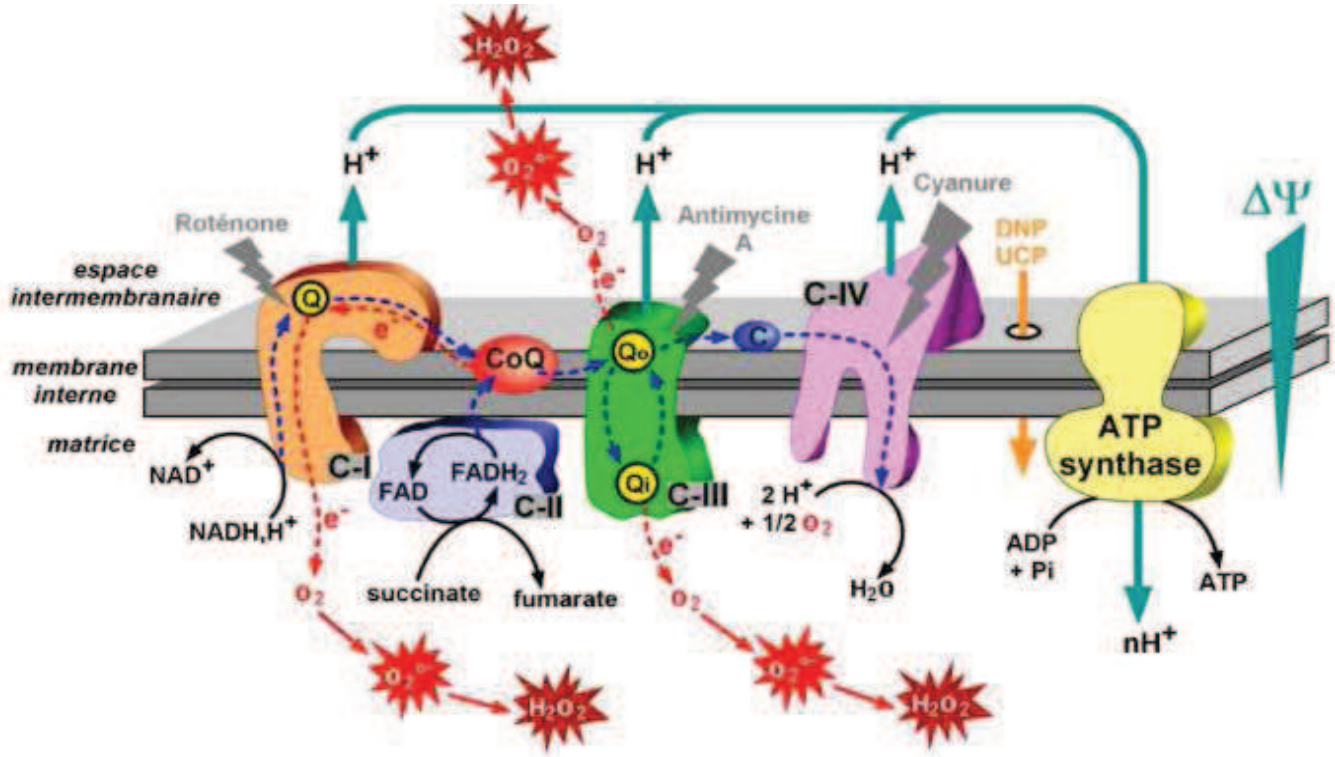


Figure 6: Chaine respiratoire (Source LBFA:http://www-lbfa.ujf-grenoble.fr/intranet/download/oxygraphie_muscle_hansatech.pdf)

- *La synthèse d'ATP*. Le complexe V ou F0/F1-ATP synthase convertit cette force créée par le gradient de protons en ATP en faisant entrer les protons dans la matrice. Le transporteur des nucléotides adényliques (ANT) permet à ces réactions de phosphorylations oxydatives de fonctionner correctement en assurant en continu la sortie d'un ATP de la matrice vers le cytosol contre l'entrée d'un ADP (Fiore, Trezeguet et al. 1998). En raison de l'imperméabilité de cette membrane, le retour se fait par l'intermédiaire d'un transporteur spécifique (F0) associé à l'enzyme de phosphorylation (F1). Le domaine membranaire F0 joue le rôle de canal à protons alors que le domaine extrinsèque hydrophile F1 du côté matriciel supporte l'activité catalytique de la F0/F1-ATP synthase, parfois appelée complexe V.

Plusieurs facteurs interviennent dans le contrôle de l'activité de la chaîne respiratoire et de la F0/F1-ATP synthase (ATP/ADP, Ca intramitochondrial, NO et protons).

Les espèces actives de l'oxygène (ROS)

Les ROS sont des espèces chimiques, neutres ou chargées, qui portent un électron célibataire sur leur couche externe. Ceci les rend instables et capables de

réagir avec d'autres molécules chimiques environnantes. Les ROS ont des rôles importants de second messager intracellulaire avec des effets principalement délétères (prolifération cellulaire, la régulation des processus d'apoptose ou l'induction de la mort cellulaire) rarement bénéfiques (processus de pré- et post conditionnement cardiaque).

Autres fonctions

La mitochondrie régule le potentiel membranaire, participe à la synthèse des hormones stéroïdes, au cycle de Krebs, au cycle de l'urée, à l'apoptose et à la régulation de la prolifération cellulaire entre autres.

3. Structure moléculaire et régulation du mPTP

Le mPTP est un pore mitochondrial situé sur la membrane interne de la mitochondrie (Veech, Valeri et al. 2012). En condition normale, ce pore est fermé et ne s'ouvre qu'en conditions d'agression cellulaire activant ainsi une cascade pro apoptotique. La structure du mPTP associerait différentes protéines comme le transporteur des nucléotides adényliques (ANT), la cyclophiline D (Cycl D), la porine (ou voltage-dependent anion channel, VDAC), la créatine kinase (CK), l'hexokinase (HK), le récepteur des benzodiazépines (PBR), ainsi que des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL et Bax) (Halestrap and Richardson 2015). Des études portant sur des modèles expérimentaux knock out (KO) pour ces protéines ont permis de discuter leur rôle dans la structure et dans la régulation du fonctionnement du mPTP (Figure 7).

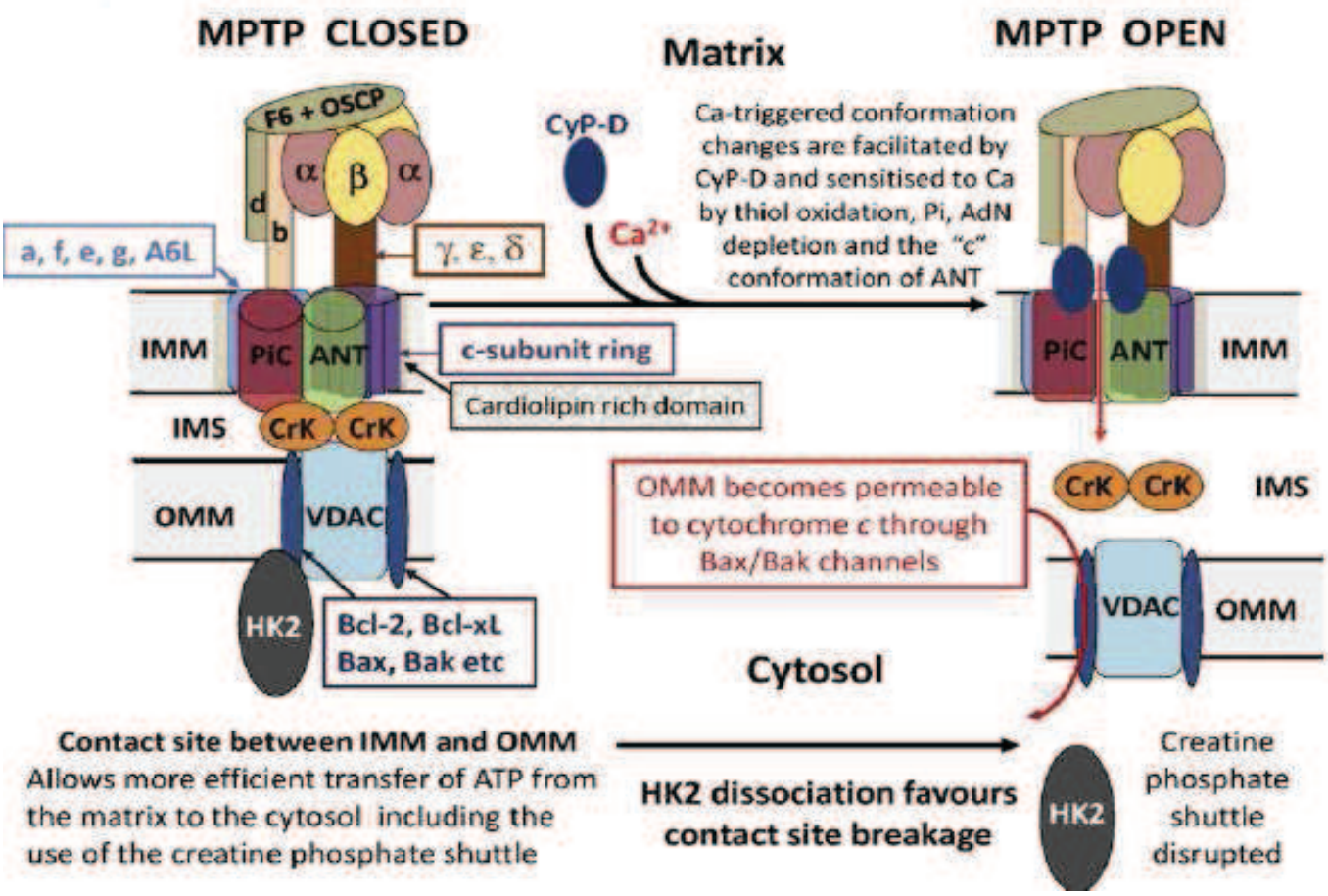


Figure 7: Schéma du mPTP *(Halestrap J Mol Cell Cardiol 2015)*

- Le transporteur des nucléotides adényliques (ANT)

L'ANT est situé sur la membrane interne mitochondriale. Il catalyse sélectivement et l'échange d'ATP contre l'ADP. Ce transport est inversé dans les conditions pathologiques. L'ATP et l'ADP semblent inhiber l'ouverture du mPTP alors que d'autres molécules n'utilisant pas l'ANT comme transporteur n'ont pas d'effet sur la régulation du mPTP (Halestrap and Davidson 1990). Cependant, l'ouverture du mPTP persiste dans les mitochondries isolées du cœur et du foie de souris KO pour 2 isoformes d'ANT, malgré une capacité de rétention calcique plus haute que chez la souris sauvage (Kokoszka, Waymire et al. 2004).

- La cyclophiline D (CyclD)

La CyclD est située dans la matrice mitochondriale. L'effet inhibiteur de l'ouverture du mPTP par la ciclosporine A (CsA) semble être lié à un effet inhibiteur sur la liaison CyclD-ANT, entrainant un changement de conformation de l'ANT (Halestrap, McStay et al. 2002, Halestrap, Clarke et al. 2004).

- La porine ou « voltage-dependent anion channel » (VDAC)

Le VDAC est situé sur la membrane externe de la mitochondrie. Différentes associations ont été évoquées comme étant à l'origine du mPTP: ANT/VDAC, le récepteur aux benzodiazépines (Kinnally, Zorov et al. 1993), la créatine kinase (O'Gorman, Beutner et al. 1997), l'hexokinase HK (Beutner, Ruck et al. 1998), la CyclD (Nicolli, Basso et al. 1996) et Bax ou Bcl-2 (Crompton 2000). Cependant, dans les mitochondries isolées chez la souris et des cellules dépourvues de différentes isoformes de VDAC, les caractéristiques propres du mPTP étaient conservées (Chiara, Castellaro et al. 2008).

- Récepteur des benzodiazépines

Ils pourraient s'associer au VDAC et à l'ANT sur la membrane externe mitochondriale (McEnery, Snowman et al. 1992). Des effets bénéfiques de ligands au récepteur ont été rapportés après une dysfonction cardiaque post ischémie-reperfusion témoignant d'un probable effet régulateur sur le mPTP (Brown, Aon et al. 2008).

- Créatine kinase mitochondriale

Située dans l'espace intermembranaire mitochondrial du cœur, du muscle et du cerveau. Elle catalyse le transfert du groupe phosphorylé de la phospho-créatine à l'ADP. Elle pourrait s'associer avec le VDAC et l'ANT pour réguler le mPTP (O'Gorman, Beutner et al. 1997, Beutner, Ruck et al. 1998).

- Cardiolipine

Phospholipide rendant imperméable la membrane interne mitochondriale. Suite à une surcharge calcique, elle entraine l'ouverture du mPTP (Petrosillo, Casanova et al. 2006). Elle est étroitement liée à l'ANT dont elle contrôle la structure et l'activité, et entraine ainsi l'ouverture du mPTP (Nury, Dahout-Gonzalez et al. 2005)

<u>Régulateurs du pore de transition</u>

- Le calcium : Inducteur principal de l'ouverture du mPTP lorsqu'il est localisé dans la matrice. Dans le cytoplasme, il diminue sa probabilité d'ouverture (Bernardi, Veronese et al. 1993).

- Les autres cations bivalents comme Sr2+, Ba2+, Mn2+ : leur mécanisme d'action diminue la probabilité d'ouverture du mPTP en se fixant sur les sites de fixation du Ca2+ (Bernardi, Veronese et al. 1993).

- Les nucléotides adényliques : Leur diminution en conditions pathologiques stimule l'ouverture du pore (Halestrap, Clarke et al. 2004).

- Le potentiel membranaire : L'ouverture du mPTP, en inhibant le gradient de protons transmembranaire, fait diminuer le potentiel membranaire mitochondrial. Cette dépolarisation peut cependant déclencher l'ouverture du mPTP en effondrant le gradient de protons et donc ainsi en acidifiant la matrice et en réalisant un efflux de Ca+ par le canal Ca uniporteur (Bernardi, Veronese et al. 1993, Petrosillo, Casanova et al. 2006).

- Le pH matriciel : L'acidose diminue la probabilité d'ouverture du mPTP, alors que l'alcalose l'augmente. (Haworth and Hunter 1979).

- Le phosphate inorganique (Pi) : Le Pi est considéré comme un puissant inducteur de l'ouverture du mPTP. Il diminue le pH matriciel et la concentration de Mg2+ (Bernardi, Vassanelli et al. 1992) et pourrait exercer ses effets inducteurs par une interaction avec la CyclD qui pourrait masquer l'action inhibitrice du Pi en bloquant son site régulateur sur le mPTP (Basso, Petronilli et al. 2008).

- Le transporteur du phosphate mitochondrial : Sa surexpression entraine une apoptose alors que sa délétion la prévient (Halestrap 2009). Ceci pourrait passer par des liaisons avec la CyclD, l'ANT ou le Pi (Basso, Petronilli et al. 2008).

- Le stress oxydant : Il facilite l'ouverture du mPTP en affectant la liaison de la CyclD à l'ANT (Halestrap, Woodfield et al. 1997).

- Le complexe I de la chaîne respiratoire : Son inhibiteur, la rotenone, semble plus efficace que la CsA pour retarder l'ouverture du mPTP de manière tissu dépendant. De même, l'ouverture du mPTP est facilitée par l'utilisation de substrats du complexe I plutôt que par un flux d'électrons en provenance d'un autre complexe (Fontaine, Eriksson et al. 1998).

- Les ubiquinones (UQ) : L'UQ 0 inhibe l'ouverture du mPTP de muscle en bloquant le flux d'électrons au travers du complexe I. Les UQ sont classées en 3 groupes selon leur effet sur le mPTP (Walter, Nogueira et al. 2000).

4. Rôle du Calcium

Le calcium est en partie à l'origine de la dysfonction mitochondriale observée au décours d'un TC. L'accumulation de calcium intracellulaire au décours d'un TC est responsable de la mort cellulaire liée au pronostic péjoratif des patients (Farooqui

and Horrocks 1994). L'inhibition de l'up régulation des canaux calciques post traumatiques diminue ainsi l'excès de relargage calcique et améliore la dysfonction mitochondriale post TC (Rao, Zhang et al. 2015). De nombreux mécanismes sont impliqués dans cette élévation de calcium intra cellulaire:

- Une entrée de Ca par des lésions membranaires directes (Buki, Okonkwo et al. 1999). Ce concept est validé par l'augmentation de perméabilité membranaire a la suite d'un TC in vivo et in vitro (Pettus, Christman et al. 1994, Pike, Zhao et al. 2000). De plus, ces lésions entrainent des perturbations dans des canaux voltage dépendants entrainant l'afflux de Na+ (Tabarean, Juranka et al. 1999). Cet afflux va conduire à une dépolarisation membranaire qui en retour va activer le canal Ca voltage dépendant (VDCC) et entrainer à son tour l'afflux de Ca (Wolf, Stys et al. 2001). Le niveau élevé de Na+ intracellulaire va inverser le canal Na/Ca, aggravant cette accumulation (Stys and Lopachin 1998, Brittain, Brustovetsky et al. 2012).

- Le relargage de Glutamate en excès et sa fixation sur ses récepteurs NMDA va entrainer l'augmentation de Ca dans la cellule (Zhang, Rzigalinski et al. 1996).

- Le relargage de Ca par le réticulum endoplasmique (RE) suite au stress est responsable à son tour d'une entrée de Ca dans la cellule par les canaux SOCs/SMOCs interprétant les stocks vides du RE comme un signal de déficit calcique (Weber, Rzigalinski et al. 2001).

- Une altération des canaux K+/ Ca sensibles (Wulff, Kolski-Andreaco et al. 2007).

- Une réduction de la quantité d'ATP.

La mitochondrie est pourvue d'un certain nombre de canaux ioniques spécifiques du calcium. L'influx de Ca2+ sert à tamponner l'excès intracytoplasmique jusqu'à ce que les capacités de la mitochondrie soient dépassées (Liu, Liu et al. 2009, Weber 2012). Il est sous la dépendance de (Bernardi 1999):

- L'uniport calcique qui utilise l'énergie du potentiel membranaire. L'abolition de l'entrée de calcium par ce pore a des effets neuroprotecteurs (Cheng, Fu et al. 2013). Il ne semble opérationnel que pour des concentrations physiologiques de Mg2+.
- Une inversion de l'échangeur Na/Ca
- Le récepteur mitochondrial calcique a la ryanodine

- Le "Rapid uptake Mode (RaM)" (Bazil and Dash 2011) détecté dans les mitochondries de foie lorsque le niveau de Ca cytosolique est très élevé est lorsque les mitochondries sont exposées à des pulses calciques répétés de 1-10s. Ce mode permettrait de réguler la bioénergétique mitochondriale. Il pourrait s'agir d'une modification de conformation de l'uniport calcique.

L'efflux de Ca2+ depuis la mitochondrie est assuré par deux transporteurs:

- Dépendant du Na+ appelé NCE (Na+-dependent pathway for Ca2+ Efflux) majoritaire dans le cœur et le cerveau
- Indépendant du Na+: NICE (Na+-Independent pathway for Ca2+ efflux) au niveau du foie (échange de 2 H+ contre 1 Ca2+).

Cet excès de Ca est considéré comme l'une des principales causes des dégâts neuronaux (Weber 2004, Slemmer, Zhu et al. 2008). En fonction de la voie d'entrée et du niveau de la concentration de Ca la mitochondrie va activer les voies de nécrose ou d'apoptose.

5. Nécrose et apoptose cellulaire

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

L'apoptose ou mort cellulaire programmée se caractérise par l'activation d'enzymes cataboliques, la néosynthèse de protéines apoptotiques (les caspases) et la destruction de différentes structures cellulaires (Pedersen, Larsen et al. 2009). L'apoptose est régulée par le système Bax/BCl2.

Il existe une voie caspase-indépendante i) et une voie caspase-dépendante ii) (Eldadah and Faden 2000).

i) **L'apoptose caspase-indépendante** est liée à la libération d'une protéine mitochondriale, l'AIF (*Apoptosis- inducing factor*) responsable de la fragmentation de l'ADN après translocation nucléaire (Bredesen, Rao et al. 2006).

ii) **Deux voies sont décrites dans l'apoptose médiée par les caspases** (Figure 8):

- La voie extrinsèque est activée par la liaison de ligands sur des récepteurs de mort membranaires (comme par exemple le TNFα et son récepteur) entrainant l'activation de la caspase 8. Elle peut activer la voie intrinsèque via la protéine Bid.
- La voie intrinsèque, mitochondriale, initiée par le stress cellulaire ou par des lésions d'ADN. L'activation de cette voie repose sur l'ouverture du mPTP. Le cytochrome c est libéré de la mitochondrie vers le cytosol et s'associe à APAF1 (Apoptosis Protease Activating Factor) et à la procaspase-9 pour former un complexe « apoptosome ». La caspase-9 est activée au sein de ce complexe et devient capable d'activer les caspases effectrices comme la caspase-3 (convergence des deux voies). Smac/DIABLO et OMI/HtrA2 ciblent et inhibent les protéines de la famille des IAP (Inhibitor of apoptosis) favorisant ainsi l'activité des caspases. Ces deux voies entrainent donc l'activation des caspases-3, -6 et -7, provoquant la fragmentation de l'ADN.

Différentes voies cellulaires vont également être activées à la suite du stress calcique et conduire à des lésions neuronales:

- Les calpaines entrainant des changements dans le cytosquelette et la membrane cellulaire (Araujo, Carreira et al. 2010).

- L'activation des caspases va conduire à une activation des endonucléases Ca dépendantes endommageant l'ADN et à une activation des phospholipases permettant le relargage d'acide arachidonique et de RLs.

- Les RLs, non contrôlés par les mécanismes de défense habituels, vont altérer l'ADN, les lipides membranaires, la peroxydation des protéines. Ceci va entrainer un cercle vicieux de relargage de Ca de ses stocks cellulaires via le di acyl Glycerol.

- Le di acyl glycerol va activer les protéines kinases C qui en modulant le VDCC et les récepteurs NMDA vont entrainer l'entrée de Ca dans les neurones.

- Une autre voie d'action est la fixation du Ca sur la calmoduline qui va réguler la NOS produisant le NO (Dawson and Dawson 1996). Ce dernier en excès va se

combiner avec le superoxyde pour former le peroxynitrite, toxique pour les lipides et protéines de la membrane et pour l'ADN.

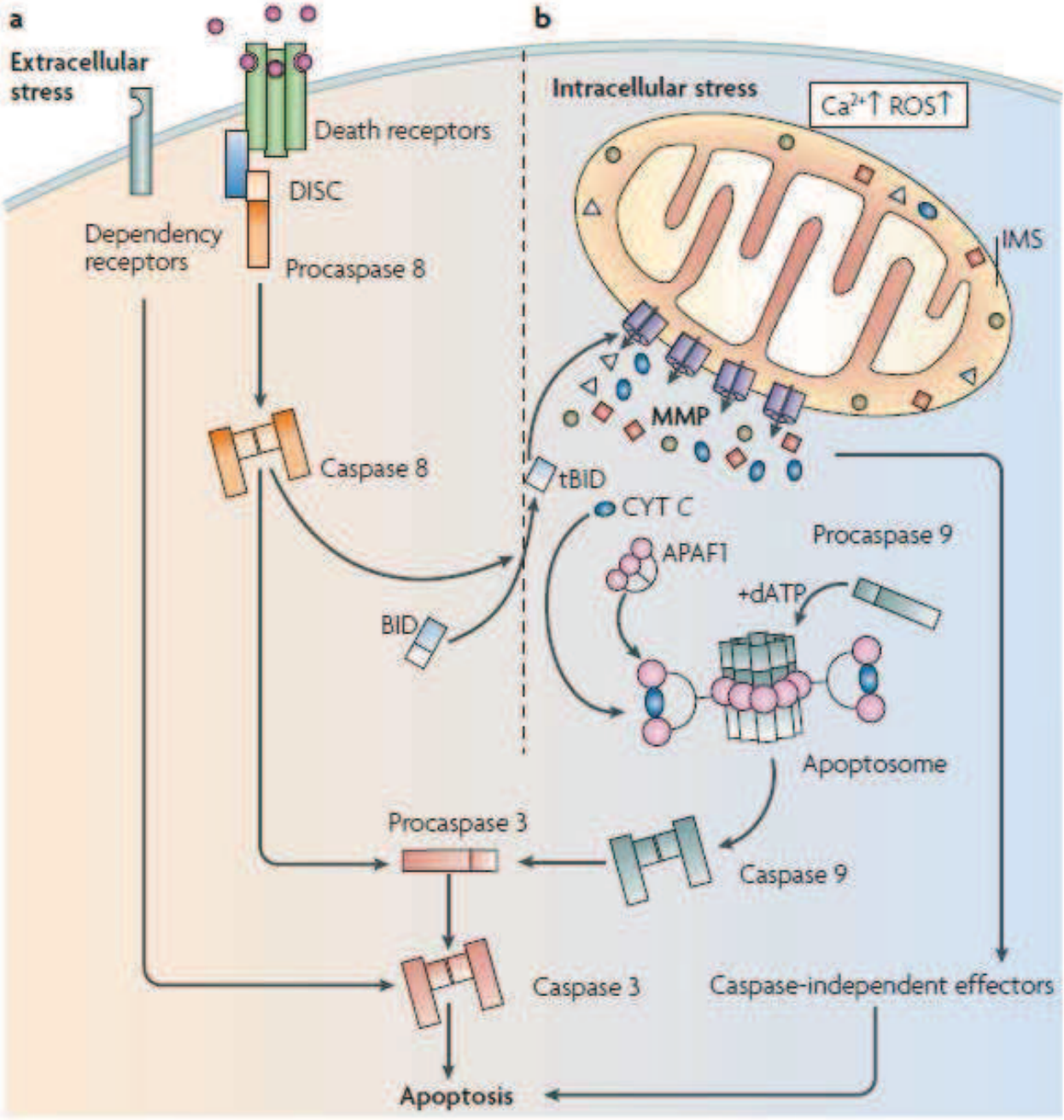


Figure 8: Voies extrinsèque (a) et intrinsèque/mitochondriale (b) de l'apoptose cellulaire caspase dépendante *(Galluzzi et al. Nat Rev Neurosc 2009)*

6. Dysfonction mitochondriale post traumatique

mPTP et TC

Pour résumer, les lésions primaires lors d'un TC entraînent au niveau extra cellulaire une accumulation de Glutamate, qui va activer le récepteur NMDA post synaptique entraînant un flux de Ca dans la cellule. Cette séquestration de calcium aboutit alors à un œdème osmotique mitochondrial (anomalies morphologiques : Figure 9) et à un dépassement des capacités bioénergétiques de la cellule par l'influx d'ions hydratés (anomalies fonctionnelles) (Lifshitz, Sullivan et al. 2004, Singh, Sullivan et al. 2006, Rasola, Sciacovelli et al. 2010, Rasola and Bernardi 2011, Enriquez and Bullock 2004).

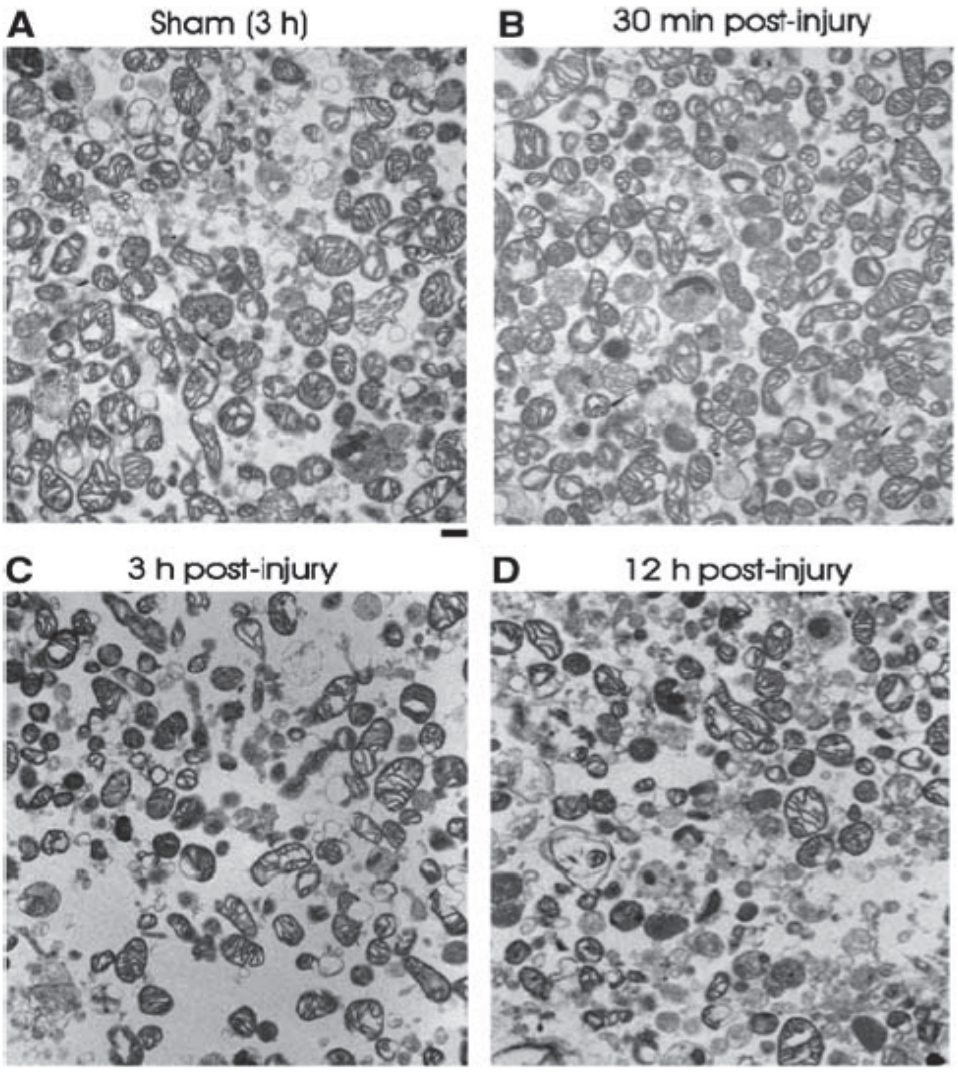


Figure 9: Microscopie électronique révélant, après un TC type impact focal, un œdème mitochondrial à 30 min puis une raréfaction mitochondriale à H3 et H12 du TC (*Singh et al. JCBFM 2006*)

En effet, la membrane mitochondriale devient perméable aux molécules de moins de 1500 Da, entrainant une dépolarisation mitochondriale et un arrêt de la production d'ATP. C'est le phénomène de transition de perméabilité. Cela explique l'augmentation de l'utilisation du glucose et la baisse de consommation d'oxygène sans ischémie cérébrale (Lifshitz, Sullivan et al. 2004). Ces lésions mitochondriales entrainent donc l'utilisation des voies métaboliques anaérobies avec élévation du lactate et des enzymes glycolytiques pour produire de l'ATP (Amorini, Lazzarino et al. 2016, Yonutas, Vekaria et al. 2016). Ce métabolisme associé à une réduction incomplète des molécules d'oxygène en lien avec les lésions mitochondriales entraine la production de RLs. Ces derniers vont altérer la membrane de la mitochondrie. La modification de la structure des protéines va aboutir à leur agrégation et fragmentation, altérant ainsi leur fonction (Lifshitz, Sullivan et al. 2004). La rupture de la membrane externe mitochondriale libère des facteurs proapoptotiques, entrainant la mort cellulaire. S'ensuivent alors une altération du transport axoplasmique, une dégénérescence Wallérienne distale des axones et des ruptures de connexions (Merenda and Bullock 2006).

En clinique humaine, ce dysfonctionnement mitochondrial est suggéré par des travaux d'imagerie par spectroscopie (Signoretti, Marmarou et al. 2008) et de mesure de la consommation en O2 de la chaîne respiratoire mitochondriale chez des patients traumatisés crâniens (Verweij, Muizelaar et al. 2000, Vlodavsky, Palzur et al. 2015)

Ce phénomène initial de transition de perméabilité reposerait sur l'ouverture du pore mitochondrial mPTP, décrit précédemment (Kristal, Stavrovskaya et al. 2004, Mazzeo, Beat et al. 2009). Sa structure n'est pas encore élucidée (Sullivan, Rabchevsky et al. 2005). La liaison CyclD-mPTP semble liée à l'augmentation de perméabilité du mPTP en présence d'un stress (Kristal, Stavrovskaya et al. 2004). En effet, chez des souris CyclD KO, la perméabilité du mPTP diminue. Lorsque ces souris subissent une ischémie cérébrale, on observe une diminution de la taille de l'infarctus cérébral. Ces animaux présentent une résistance accrue aux dystrophies musculaires, à la sclérose latérale amyotrophique, à la maladie d'Alzheimer… (Schinzel, Takeuchi et al. 2005). En réponse au stress oxydatif (Cao, Gao et al. 2016), la CyclD matricielle migrerait et viendrait s'associer à l'ANT sur la membrane interne de la mitochondrie induisant un changement conformationnel permettant l'augmentation de la perméabilité membranaire par ouverture du mPTP. On observe

une élévation du seuil d'ouverture du mPTP en présence d'inhibiteur de cette interaction (CsA…) (Halestrap 2009). Singh et al. en 2006, dans un modèle de percussion latérale après craniotomie chez la souris, retrouvaient une diminution du seuil d'ouverture du pore après l'addition de Ca (Singh, Sullivan et al. 2006). Buki et al. en 2000, dans un modèle de TC "impact accélération" ont retrouvé un relargage de cyt c et une activation des caspases dès 30 min post TC (Buki, Okonkwo et al. 2000). Le gonflement mitochondrial apparaît dès 10 min post TC et semble réversible si les mécanismes de réparation cellulaire sont intacts et si le mPTP ne s'est pas ouvert (Sullivan, Thompson et al. 1999).

L'évolution secondaire se fera en fonction des capacités métaboliques résiduelles de la cellule soit vers la nécrose, soit vers l'apoptose (Crompton 2000, Borutaite and Brown 2003). Des mécanismes d'amplification du signal apoptotique à la suite de l'ouverture du pore ont été décrits: libération des SIMP (Soluble Inter Membrane mitochondrial Proteins) dont font partie le cyt c et l'AIF (Apoptosis-Inducing Factor) et activation de la caspase 3 (Cernak, Chapman et al. 2002). Ces protéines vont alors activer les caspases effectrices à l'origine de la fragmentation de l'ADN. Le cyt c altère également la respiration mitochondriale et majore le stress oxydant (Borutaite and Brown 2003). Les SIMPs peuvent sortir de la mitochondrie par perméabilisation de la membrane externe faisant intervenir les protéines de la famille Bcl-2 (Bax ou Bak). En l'absence de signal pro-apoptotique, Bcl-2 peut inhiber l'activation de Bax. Le mPTP peut ne pas être nécessaire pour l'apoptose. En effet, des cellules CyclD-/- restent très sensibles aux stimuli pro apoptotiques malgré une résistance accrue au stress calcique et à la nécrose (Nakagawa, Shimizu et al. 2005).

Des thérapeutiques agissant sur cette dysfonction mitochondriale ont ainsi été étudiées. L'injection d'un inhibiteur du mPTP améliore les performances neurocognitives, les dommages mitochondriaux et les lésions du stress oxydant à la suite d'un TC expérimental focal (Readnower, Pandya et al. 2011). Des biopsies cérébrales et hépatiques effectuées chez 5 patients ont montré une diminution du dysfonctionnement mitochondrial après administration de CsA (Hansson, Morota et al. 2011). Sullivan et al., lors d'une contusion focale chez l'animal, ont identifié une baisse du seuil d'ouverture du mPTP qui revenait à sa ligne de base après administration d'un inhibiteur de l'ouverture du pore, la CsA (Sullivan, Thompson et

al. 1999). Un effet neuroprotecteur d'une molécule anti apoptotique a été décrit médié par la voie de signalisation Pi3K/Akt (Chen, Tsai et al. 2012).

Chaine respiratoire et TC

Chez 16 patients atteints d'un hématome intra cérébral, l'analyse par oxygraphie de mitochondries extraites lors de la chirurgie retrouvait une diminution de la production d'ATP, expliquant les diminutions de l'OEF à DSC préservé (Verweij, Muizelaar et al. 2000). Des études expérimentales retrouvent également une diminution de la production d'ATP notamment dans un modèle de TC focal dès H3 post-traumatique (Lifshitz, Sullivan et al. 2004, Singh, Sullivan et al. 2006) (Figure 10). Une diminution du Respiratory Control Ratio (Etat 3/ Etat 4 : RCR) était notée chez des rats ayant subi un TC focal avec prévention de cette dysfonction par un inhibiteur de la péroxydation lipidique (Singh, Gilmer et al. 2013). D'autres auteurs ont décrit une dysfonction du complexe IV de la chaine respiratoire au décours d'un TC expérimental (Harris, Black et al. 2001). Cette dysfonction prédominait du côté ipsilatéral avec essai de compensation par surexpression de l'ARNm de la protéine au niveau controlatéral (Dai, Cheng et al. 2009).

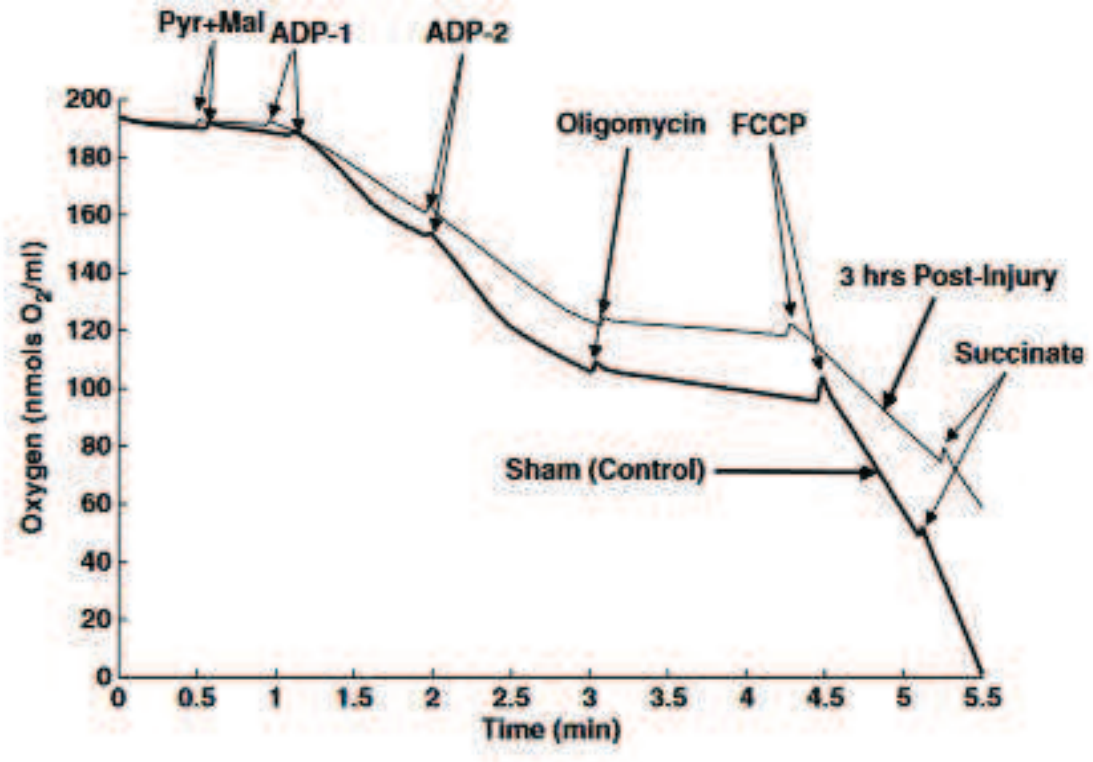


Figure 10: Baisse de la pente de consommation en oxygène chez les rats ayant subi un TC focal *(Singh et al. JCBFM 2006)*

Chez des rats subissant un TC diffus, les auteurs observaient une baisse de la manganese superoxide dismutase et des taux de protéines des complexes I III V de la chaine respiratoire à H24 du TC avec mitophagie anormale à 6 semaines du TC (Chen, Chan et al. 2016). Cette constatation a été également faite par Harmon et al. dans leur modèle de TC focal avec élévation des molécules perturbant l'homéostasie mitochondriale à J6 post TC (Harmon, Gibbs et al. 2016). Lors de TC expérimentaux focal et diffus chez le rat, une élévation du taux d'ADN mitochondrial sanguin à H6 et H25 du TC était retrouvée, corrélée au niveau de lésions de la chaine respiratoire mitochondriale (Kilbaugh, Lvova et al. 2015). Chez l'humain, le cyt c était retrouvé en quantité plus importante au décours d'un TC dans le LCR avec impact sur le pronostic des patients (Satchell, Lai et al. 2005). Les taux sanguins de différents complexes de la chaine respiratoire des patients subissant un TC étaient corrélés au devenir neurologique à 1 an (Sinha, Raheja et al. 2016).

L'administration post TC focal d'un inhibiteur de la monoamine oxydase diminuait ainsi la dysfonction de la chaine respiratoire mitochondriale chez le rat (Cebak, Singh et al. 2016). Ces dommages mitochondriaux semblent prédominants dans les mitochondries synaptiques à H24 d'un TC focal. L'administration de CsA intra péritonéale permettrait d'améliorer la respiration cellulaire mitochondriale synaptique et non synaptique (Kulbe, Hill et al. 2016).

7. Méthodes d'évaluation de la fonction mitochondriale

Capacité de rétention calcique (CRC)

L'étude du seuil d'ouverture du mPTP et donc de la résistance mitochondriale au stress calcique peut être réalisée par analyse de la CRC obtenue par des ajouts réguliers ex vivo de petites quantités de calcium sur les mitochondries isolées extriates d'un cerveau frais par ultracentrifugation. La CRC du pore correspond à la quantité de calcium nécessaire à apporter pour obtenir l'ouverture du pore. En pratique, une quantité fixe de mitochondries est exposée de manière régulière (toutes les minutes) à un ajout d'une quantité fixe de calcium afin d'observer en spectrofluorimétrie l'absorption du calcium du milieu extra vers le milieu intra mitochondrial jusqu'à ce que les capacités d'absorption mitochondriales de Ca soient

dépassées entrainant l'ouverture du mPTP. Ce test ne reflète pas la fonctionnalité du mPTP in vivo mais plutôt les capacités maximales du pore en conditions extrêmes.

Etude de l'apoptose

- Etude immunohistochimique: marquage TUNEL, caspase 3 clivée

Ces études immunohistochimliques permettent l'analyse en microscopie optique de différents composants cellulaires par un marquage spécifique de marqueurs de l'apoptose.

Le principe de la technique de TUNEL est de révéler la présence de cassures dans l'ADN par une réaction de polymérisation avec par la suite mise en évidence, via une réaction de coloration, de nucléotides modifiés. L'utilisation de la déoxynucléotidyltransférase (Tdt, pour Terminal déoxynucléotidyltransférase), permet d'ajouter des désoxyribonucléotides aux extrémités 3' OH terminales de l'ADN. Un système de révélation est associé à ces nucléotides (par exemple, déoxyuridine biotinylée).

Au sein des tissus, l'apoptose peut être recherchée également par la détection immunologique des formes clivées/activées des caspases, protéases initiatrices ou exécutrices de l'apoptose. La détection immunocytochimique de la caspase-3 clivée, sert couramment à mettre en évidence la présence de cellules apoptotiques.

- Etude du cytochrome c

Cette mesure peut être effectuée par spectrométrie de masse (séparation en phase gazeuse de molécules chargées en fonction de leur rapport masse/charge) ou chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) (séparation de composés entraînés par un liquide (phase mobile) à travers un solide divisé (phase stationnaire) qui est soit placé dans un tube (colonne chromatographique), soit fixé sur une surface inerte) ou une association des deux.

Etude du calcium intra mitochondrial

Cette étude permet de déterminer si les taux de calcium matriciels augmentent en conditions pathologiques. Ceci permet ainsi d'associer cette élévation de Ca à un effet délétère secondaire (déclenchement d'une cascade apoptotique...). Elle peut se faire par le biais de différentes techniques (sondes Rhod 2, Immunofluorescence, Spectrofluorimétrie...). La méthode utilisée peut être la spectrométrie d'émission ou d'absorption. La première, utilisée ici, présente deux

avantages : plus de sensibilité avec moins d'interférence et analyse qualitative possible de plusieurs éléments. La spectrométrie d'émission atomique plasma-couplée correspond à l'étude optique des radiations émises par les atomes passés dans un état excité (ionisé). L'ionisation est réalisée dans une torche à plasma. La source lumineuse provient de l'échantillon, mais la torche à plasma permet d'atteindre des températures de l'ordre de 8000K, augmentant ainsi le nombre d'atomes à l'état excité, et donc la sensibilité. Le principe repose sur le fait que les électrons des atomes excités (ionisés), lorsqu'ils retournent à l'état fondamental, émettent un photon dont l'énergie (longueur d'onde) est caractéristique de l'élément. La lumière émise par le plasma est en ce cas analysée par un ou plusieurs monochromateurs, par un réseau polychromateur, ou encore une combinaison des deux. La lumière émise par l'élément recherché est alors détectée et mesurée, et son intensité comparée à celle émise par le même élément contenu dans un échantillon de concentration connue.

Etude en microscopie électronique (ME) (cf œdème cérébral)

L'étude des mitochondries en ME permet d'observer les anomalies morphologiques observées au décours de conditions pathologiques. A la suite d'un TC les mitochondries présentent un gonflement matriciel une rupture de la membrane externe et désorganisation des crêtes de la membrane interne (Singh, Sullivan et al. 2006). Cette analyse permet de localiser les sous types cellulaires préférentiels où sont observées ces anomalies (Lifshitz, Janmey et al. 2006)

Chaine respiratoire mitochondriale en oxygraphie

La chaine respiratoire est étudiée en oxygraphie à l'aide d'une électrode de Clark dans des conditions mimant le milieu humain (température 37°C, ajouts de substrats et de molécules énergétiques). En pratique, un substrat de la série de complexes I III IV ou II III IV est ajouté à une suspension de mitochondiries fraiches extraites du cerveau également par ultracentrifugation. Ensuite, on ajoute de l'ADP pour initier l'état III (ou stade de phosphorylation oxydative où la consommation en oxygène s'accélère), suivi par l'addition d'oligomycine, un inhibiteur de l'ATPase, pour monitorer l'état IV de la respiration (ralentissement de la consommation en O2). Le rapport état III/ état IV correspond au respiratory control ratio (RCR) et sert à

évaluer la fonctionnalité de la chaine respiratoire. Cependant, elle ne reflète pas les conditions réelles in vivo car en situation pathologique les substrats et différents apports énergétiques peuvent être défaillants. Cette mesure permet d'évaluer le bon fonctionnement de la chaine respiratoire en conditions énergétiques optimales.

8. Conclusion

La dysfonction mitochondriale post traumatique comporte donc plusieurs volets : anomalies morphologiques et fonctionnelles avec trouble de la chaine respiratoire et apoptose cellulaire. Ces anomalies fonctionnelles sont en partie responsables de la morbimortalité de cette pathologie. L'amélioration de cette dysfonction mitochondriale permettrait ainsi d'améliorer le pronostic neurologique des patients.

Cette dysfonction mitochondriale permet d'introduire le paragraphe suivant concernant les troubles du métabolisme cérébral survenant en post traumatique. En effet, cette dysfonction a des conséquences importantes sur le métabolisme cérébral comme ceci va être décrit.

D. Métabolisme cérébral du glucose et du lactate : conditions normales et pathologiques post traumatiques

1. Glycolyse : généralités

Le maintien d'une fonction cérébrale correcte, impliquant un métabolisme correct, passe par la régulation de trois éléments (Verweij, Amelink et al. 2007) : le transport cérébral en O2, le métabolisme énergétique et le rapport entre les deux.

Le cerveau représente 2-3% du poids corporel mais utilise 20% de l'énergie produite par l'organisme répartie ainsi: 50% pour l'activité synaptique, 25% pour le maintien des gradients ioniques transmembranaires et le reste pour la biosynthèse des différents constituants cellulaires. Les neurones consomment la majorité de cette énergie bien que les cellules gliales soient plus importantes en nombre.

En conditions normales, l'énergie est produite majoritairement en conditions aérobies par le cycle de Krebs. La majorité des molécules issues de la dégradation des protéines, acides gras et glucose sont converties en acetyl-CoA. Le glucose est le seul substrat énergétique du cerveau en conditions physiologiques (120g consommé par jour soit 420kcal) (Oddo, Schmidt et al. 2008, Carre, Ogier et al. 2013). Il est transporté par GLUT1 dans les astrocytes à travers la BHE et par GLUT3 au niveau neuronal. Ces récepteurs sont uprégulés en conditions pathologiques. Ce glucose va ensuite servir dans 3 voies différentes :

- Neurotransmetteur dans des voies de signalisation (Patet, Suys et al. 2016).
- Maintien du potentiel redox cellulaire dans la voie du pentose phosphate et lutte contre le stress oxydant.
- Substrat énergétique qui au cours de la phosphorylation oxydative en conditions aérobies va produire de l'ATP (Figure 11).

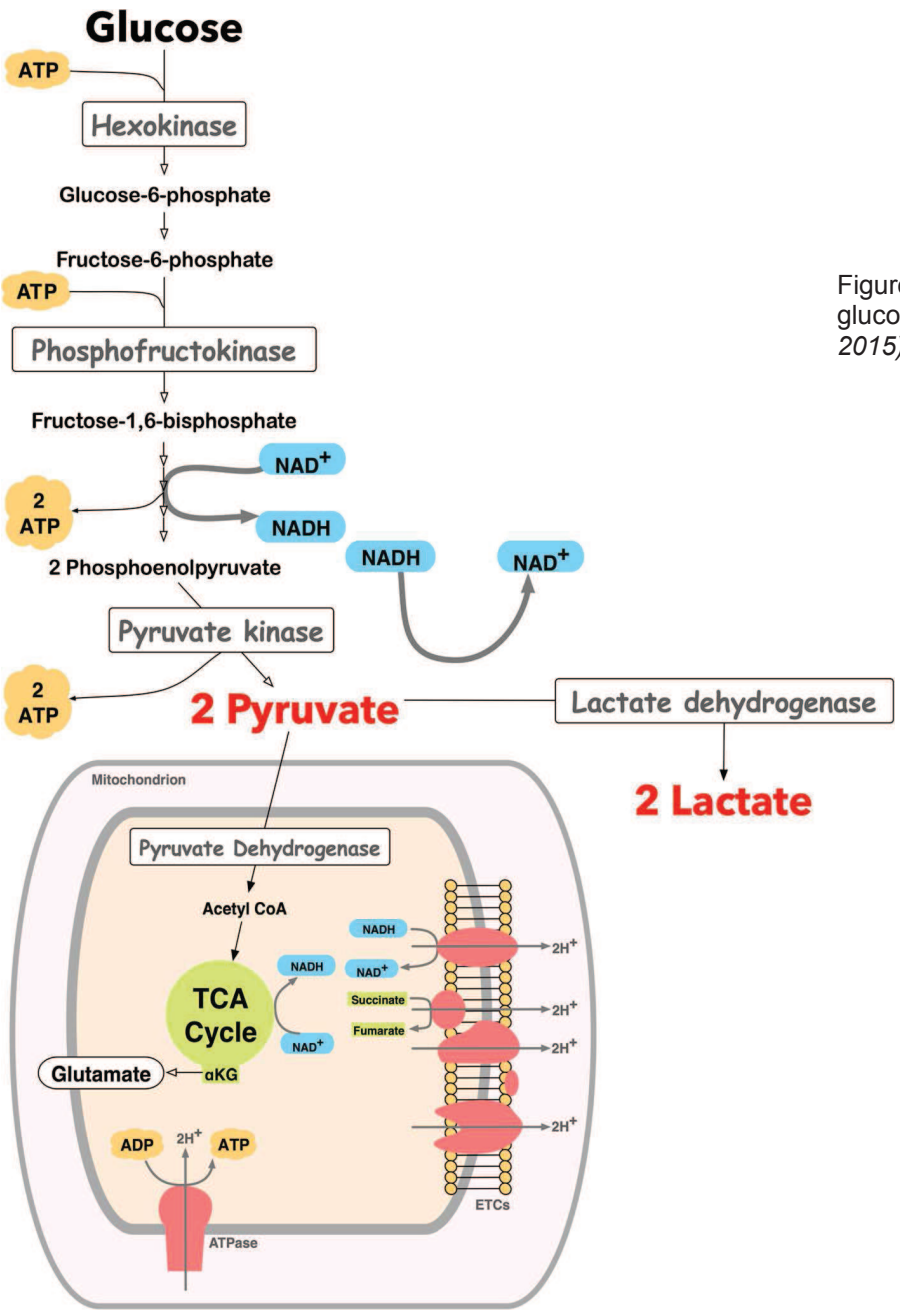


Figure 11: Voies de métabolisme du glucose *(Jalloh et al. Metab Brain Dis 2015)*

A la suite d'un TC, survient une crise métabolique en rapport avec une inadéquation entre les besoins énergétiques croissants et un DSC inadapté en raison d'une autorégulation cérébrale perturbée (Vespa 2003, Rostami 2014). L'augmentation de l'activité neuronale, entraine la libération de glutamate et de K+ recaptés par les astrocytes en consommant de l'énergie. Ceci entraine une hyperglycolyse cérébrale avec utilisation du glucose cérébral (stock en glycogène pauvre au niveau du cerveau) (Bergsneider, Hovda et al. 1997, Soustiel and Sviri 2007, Stein, McArthur et al. 2012, Hutchinson, O'Connell et al. 2009).

2. Glycolyse post traumatique : origine du lactate endogène

Après un TC, on observe une élévation du lactate endogène. Cette augmentation se produit en conditions anaérobies et aérobies y compris en dehors de toute baisse de perfusion cérébrale ou d'hypoxie cérébrale (Vespa, Bergsneider et al. 2005, Goodman, Valadka et al. 1999). En effet, le lactate augmente de 65% en conditions de DSC et de PO2 normales (Zauner, Doppenberg et al. 1997). Cette élévation est majoritairement non ischémique (Sala, Suys et al. 2013) et provient :

- Principalement de l'hyperglycolyse post traumatique astrocytaire par un switch dans les voies normales du métabolisme cérébral du glucose qui transforme le pyruvate en lactate (Glenn, Kelly et al. 2003, Carpenter, Jalloh et al. 2015)
- D'une augmentation de l'activité du cycle du pentose phosphate (Dusick, Glenn et al. 2007).
- De la recapture du lactate circulant. La participation de ce dernier au métabolisme cérébral augmente de manière importante quand son taux circulant augmente, en traversant la BHE grâce au transporteur monocarboxylate (MCT) (Glenn, Martin et al. 2015). Ce transporteur est augmenté à la suite d'un TC chez l'animal (Prins and Giza 2006). Les neurones possèdent essentiellement le MCT2 tandis que les astrocytes plutôt MCT1, 2, et 4 (Chih and Roberts Jr 2003) (Figure 12).

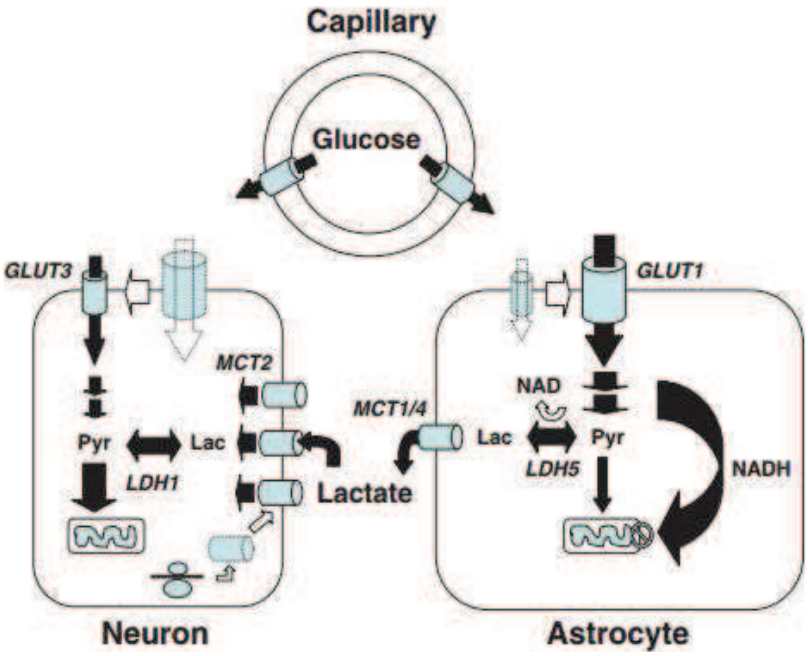


Figure 12 : Transporteurs monocarboxylate MCT du lactate a la surface des astrocytes et des neurones (hypothèse de la navette lactique astrocytaire neuronale) *(Pellerin et Magistretti, JCBFM 2012)*

En conditions normales, il existe un équilibre entre la production (glycolyse majoritairement) et l'élimination (phosphorylation oxydative) du lactate. L'échange de lactate entre les sites de production et d'élimination a été identifié tôt comme la "lactate shuttle" ou la navette neurones-astrocytes de lactate (Brooks 1986). Selon l'hypothèse de Pellerin et al. (Pellerin and Magistretti 1994, Pellerin and Magistretti 2012), au cours d'une phase précoce, le glutamate libéré dans la fente synaptique se fixe sur les récepteurs AMPA, générant un potentiel post synaptique excitateur qui se propage le long du dendrite neuronal et entraine l'ouverture de canaux Na+ voltage dépendants responsables d'une entrée massive de Na+ dans le neurone. Le gradient ionique est rétabli grâce à l'activation alors de la pompe Na/K ATPase, ce qui consomme beaucoup d'énergie et donc d'ATP. Ceci stimule la phosphorylation oxydative et donc entraine une baisse des niveaux de NADH. En conséquence, l'activité du cycle de Krebs pour fournir ces intermédiaires est augmentée avec utilisation du pyruvate et donc du glucose et du lactate, ce dernier étant selon certains auteurs utilisé préférentiellement par le neurone (Serres, Bezancon et al. 2004, Schurr 2006, Boumezbeur, Petersen et al. 2010, Schurr 2014). Lors de la phase plus tardive, le glutamate est recapté par les astrocytes par des récepteurs spécifiques GLAST et GLT1 avec entrée astrocytaire de Na+ activant également la Na/K ATPase puis le transport du glucose et son utilisation dans l'astrocyte. La stimulation ainsi de la glycolyse aérobie astrocytaire entraine l'élévation des niveaux de NADH qui se normalisent en favorisant la transformation du pyruvate en lactate. Le lactate est ensuite expulsé dans le milieu extracellulaire grâce aux transporteurs MCT1 et 4, répondant ainsi à l'augmentation de la demande neuronale. Lors d'une stimulation intense prolongée, le glutamate stimule également la glycogénolyse astrocytaire (Patet, Suys et al. 2016). Le glucose est ainsi métabolisé en lactate au niveau des astrocytes et transporté secondairement dans le milieu extra cellulaire (Carre, Ogier et al. 2013) et recapté par les neurones pour être utilisé dans le cycle de Krebs (Alessandri, Doppenberg et al. 1999, Chen, Qian et al. 2000) (Figure 13). Une amélioration de la disponibilité des substrats énergétiques au cerveau, probablement médiée par les navettes lactiques avec mobilisations des réserves en glycogène rénale et hépatique, a été retrouvée chez des patients victimes de TC (Glenn, Martin et al. 2015). Tout cela a des conséquences cliniques: un contrôle trop étroit de la glycémie pourrait ainsi être plus délétère qu'un contrôle plus permissif sur le plan du métabolisme cérébral (Kramer, Roberts et al. 2012).

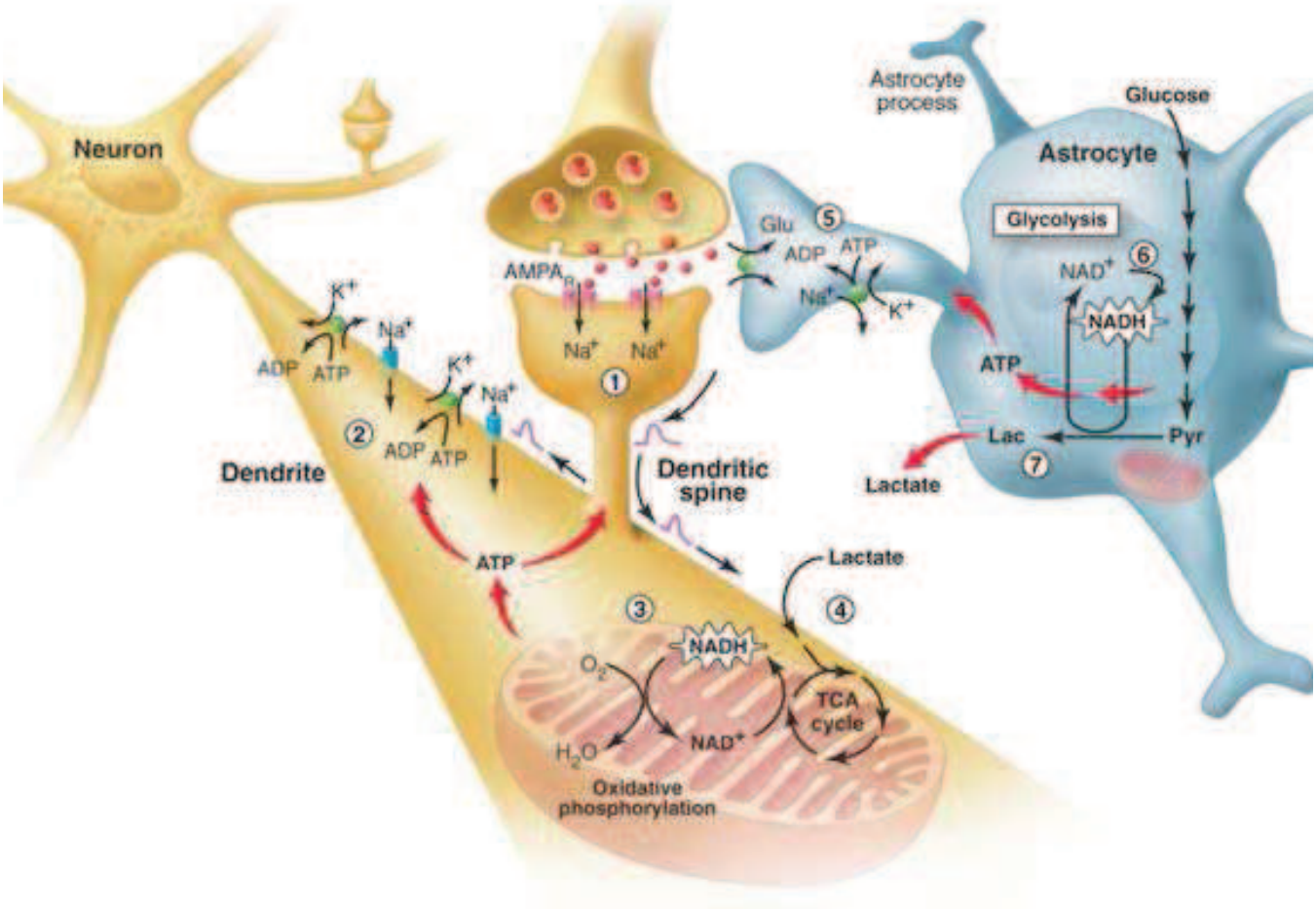


Figure 13 : Théorie de la navette lactique astrocytaire neuronale avec phases précoce (1-4), tardive (5-7) *(Pellerin et Magistretti, JCBFM 2012)*

Ce lactate servirait également comme une hormone régulatrice: son élévation entraine une inhibition de la glycolyse redirigeant ainsi le glucose vers la voie du pentose phosphate via le récepteur hydroxycarboxylic acid receptor HCA1 (Bartnik, Sutton et al. 2005, Dusick, Glenn et al. 2007). Le lactate interviendrait également dans les processus de plasticité synaptique et de mémorisation à long terme (Suzuki, Stern et al. 2011). Ces données supportent le concept du lactate comme substrat énergétique alternatif pour le cerveau traumatisé (Bouzat and Oddo 2014).

Certains auteurs s'opposent à cette théorie d'ANLS (astrocyte-neuronal lactate shuttle). Le glucose serait le substrat énergétique principal des neurones car leur capacité de transport du glucose serait supérieure à celle des astrocytes (Simpson, Carruthers et al. 2007, DiNuzzo, Mangia et al. 2010). Patel et al., ont étudié chez des rats 2 concepts différents: l'ANLS et un modèle indépendant où neurones et astrocytes captent et oxydent le glucose en fonction de leurs besoins respectifs de manière indépendante. Le résultat était en faveur du modèle

indépendant (Patel, Lai et al. 2014). De même, selon Chih et al., en conditions physiologiques, les neurones semblent utiliser le glucose comme substrat énergétique principal en fonction de leur demande propre (Chih and Roberts Jr 2003). Cependant, les auteurs n'excluent pas l'utilisation du lactate en conditions de neuroglucopénie. Or, chez des souris KO pour GLUT3, on ne constate pas de défaillance énergétique (Stuart, Ross et al. 2011) contrairement aux souris déficientes en GLUT1 (Wang, Pascual et al. 2006). De même, les astrocytes démontrent un pouvoir de recapture du lactate plus important que les neurones (Gandhi, Cruz et al. 2009, Wyss, Jolivet et al. 2011). Selon Bak et al., le lactate extracellulaire servirait plus à supporter le métabolisme basal neuronal que la neurotransmission synaptique. Le métabolisme oxydatif du lactate reposerait beaucoup plus sur l'activité de la navette malate aspartate que celui du glucose (Bak, Walls et al. 2009).

Une autre hypothèse intéressante soulevée pour expliquer cette augmentation de lactate endogène est en lien avec la dysfonction mitochondriale qui survient au décours d'un TC, avec difficulté d'utilisation du substrat au niveau de la phosphorylation oxydative neuronale (Verweij, Muizelaar et al. 2000). En effet, des niveaux extracellulaires de lactate bas sont associés à un meilleur devenir (Timofeev, Carpenter et al. 2011). Cela pourrait donc être expliqué par le fait que ce lactate a été correctement utilisé par les neurones et donc que la mitochondrie est fonctionnelle (Gallagher, Carpenter et al. 2009, Timofeev, Carpenter et al. 2011, Timofeev, Czosnyka et al. 2011). La quantité de lactate semble corrélée au niveau de PtiO2 et donc au niveau de CBF (Menzel, Doppenberg et al. 1999, Zauner, Clausen et al. 2002). Ainsi, Dienel et al. en 2014, sont en faveur de cette hypothèse d'élévation de lactate sur dysfonction mitochondriale (Chen, Tsai et al. 2012, Nielsen, Bindslev et al. 2013, Dienel 2014, Dienel, Rothman et al. 2016). Ces auteurs observent que les résulltats des études obtenues en microdialyse cérébrale ne sont pas une preuve du bénéfice de ces taux augmentés de glucose extracellulaire ou de l'utilisation du lactate comme substrat bioénergétique. En effet, en cas de dysfonction mitochondriale, ce lactate ne serait pas métabolisé et pourrait être néfaste. L'élévation du glucose observée pourrait être uniquement le reflet d'une inhibition de la glycolyse, de la glycogénolyse ou de la voie du pentose phosphate par le lactate en excès. La figure 14 résume ces idées. Ces études en microdialyse doivent donc

s'accompagner d'une mesure du métabolisme oxydatif (Dienel, Rothman et al. 2016) ou de mesures intracellulaires.

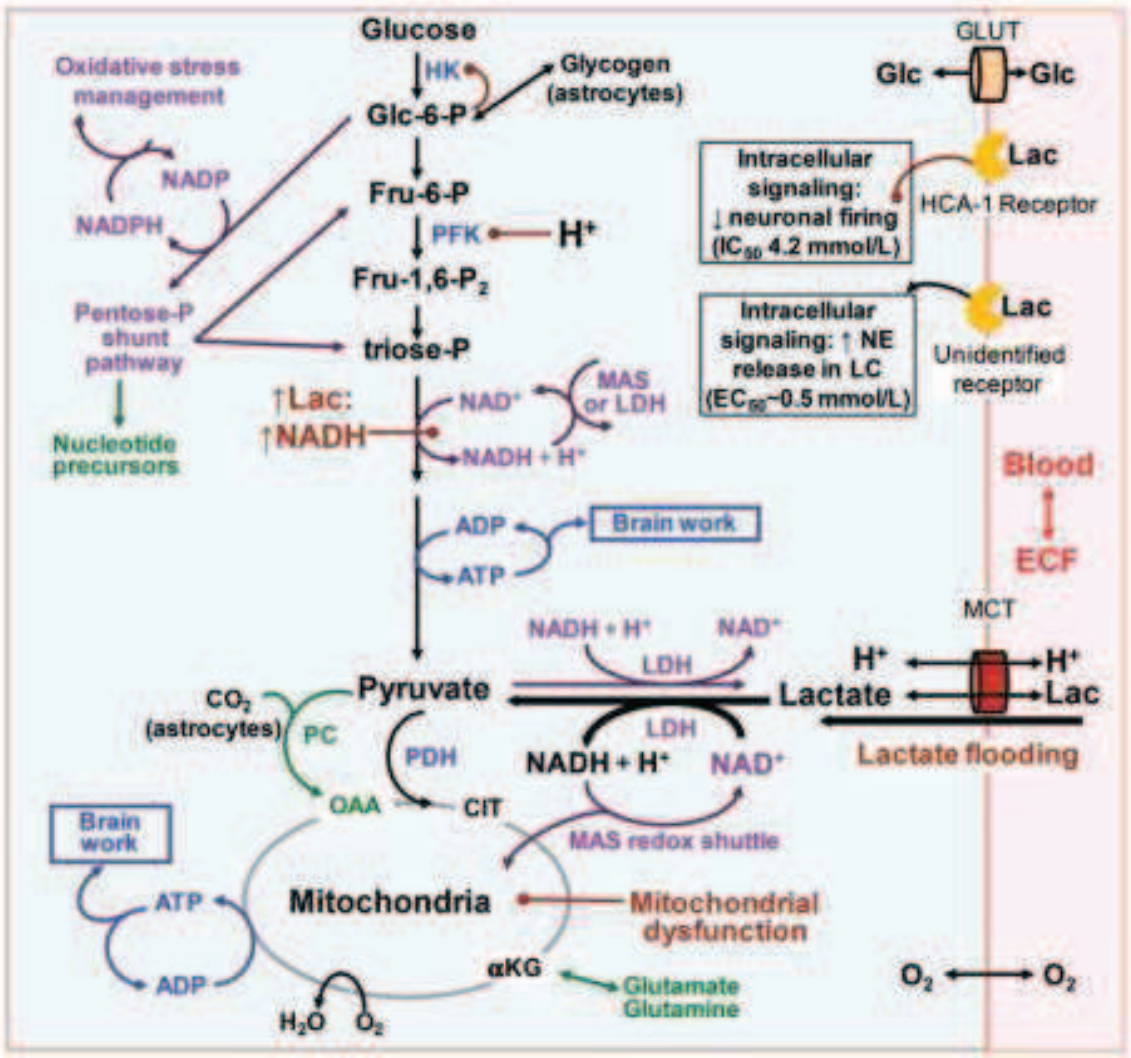


Figure 14 :
A/ Voies métaboliques potentiellement touchées par un excès de lactate après un TC : activation de la lactate deshydrogenase avec synthèse de pyruvate et de NADH avec entrée simultanée de H+ acidifiant le cytoplasme. Cette acidification inhibe la phosphofructokinase. Une augmentation du Glucose 6 phosphate entraine un feedback négatif sur l'hexokinase. La réduction du NAD+ perturbe également le flux glycolytique. Le lactate ne peut également pas être oxydé si la navette malate aspartate (MAS) est mise en défaut ou après une dysfonction mitochondriale *(Dienel et al; JCBFM 2016)*

3. Méthodes d'évaluation du métabolisme cérébral

Spectroscopie par résonance magnétique (SRM)

Il s'agit d'une technique d'exploration in vivo, utilisant la technique IRM tout en identifiant des molécules intervenant dans le métabolisme cérébral dans des voxels

ou régions d'intérêt bien définies (Jalloh, Carpenter et al. 2015). Les 1H et 31P SRM sont les plus utilisées et étudient le métabolisme de manière non invasive sans injection de traceurs. La spectroscopie 1H permet l'étude du N Acetyl Aspartate (NAA), de la choline contenue dans les phospholipides, de la créatine et la phosphocréatine, du lactate, du myoinositol, du glutamate, du GABA et des lipides. L'apparition de signaux dans le SRM est influencée par le choix du temps d'écho (TE). Typiquement, dans les travaux en 1H SRM, les taux de lactate et d'autres métabolites sont exprimés en rapports à la créatine totale. Une quantification absolue et précise des signaux métabolites est difficile. La 31P SRM permet elle plus l'étude de l'ATP, des taux de phosphocréatine ou de Pi afin d'établir des rapports permettant d'évaluer la fonction mitochondriale.

Microdialyse cérébrale

La microdialyse cérébrale permet un échantillonnage in vivo continu des molécules du liquide extracellulaire cérébral. Le principe repose en l'introduction dans le cerveau d'une sonde contenant une membrane semi-perméable à l'eau et aux petites molécules, perfusée en continu avec une solution, séparant donc le milieu extracellulaire cérébral et le milieu de perfusion. Les molécules sont alors échangées par simple diffusion dans les deux directions. Des microéchantillons permettent un monitorage répété des concentrations dans le milieu interstitiel.

La microdialyse cérébrale permet des mesures du :

- Taux de neurotransmetteurs
- Métabolisme énergétique cérébral. Le glucose extracellulaire reflète la balance entre les apports et l'utilisation du glucose par les cellules (Fellows, Boutelle et al. 1992). Le rapport lactate/pyruvate extracellulaire reflète l'état d'oxydoréduction intracellulaire qui est en relation étroite avec le fonctionnement mitochondrial. Sa valeur normale serait inférieure à 20. Ainsi, chez l'homme, en cas d'hypoxie cérébrale sévère (PtiO2<10 mmHg), le profil métabolique retrouvé en microdialyse est une augmentation du lactate, du rapport lactate/pyruvate et une diminution du glucose (Valadka, Goodman et al. 1998).
- Du glycérol.

Une limite de cette technique est l'interprétation des données en valeurs absolues. De plus, c'est une technique focale.

Etude en carbone 13 (13C)

Le 13C est un isotope naturellement stable pouvant étre détecté par spectroscopie ou par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. La capacité de la RMN à identifier le métabolite et les positions intra-moléculaires précises du 13C signifie que ces modes d'étiquetage particuliers observés dans les métabolites permettent de déterminer l'activité relative des voies métaboliques. L'administration se fait par voie IV ou par microdialyse cérébrale. Ces études ont permis d'étudier l'hyperglycolyse et l'up régulation de la voie du pentose phosphate en post TC ainsi que le cycle de Krebs en couplant le marquage de certaines molécules au 13C et la réalisation de SRM, de TEP ou de gradients artérioveineux (Bartnik, Sutton et al. 2005, Dusick, Glenn et al. 2007, Carpenter, Jalloh et al. 2014).

Gradient artério veineux en oxygène

Ceci a permis les 1éres études du métabolisme énergétique. Kety et Schmidt en 1948, ont appliqué le principe de Fick pour calculer le DSC et la CMRO2 : la quantité de substance qu'un tissu retire ou libère dans la circulation est égale au produit du flux sanguin vers le tissu et la DAV de ce tissu. Ainsi, le taux métabolique cérébral de consommation d'un produit (CMR), peut être calculé. Cette technique a été utilisée au cours du TC (Glenn, Kelly et al. 2003). Les limites de cette technique sont le manque de résolutions spatiale et temporelle et le défaut de détection des différences de métaboliques entre les différentes zones cérébrales.

Tomographie émission positrons (TEP)

Un traceur marqué est recapté de la circulation sanguine au niveau cérébral et phosphorylé par l'hexokinase au cours de la glycolyse. Ce dernier reste alors bloqué à ce stade permettant initialement à Sokoloff et al. en 1977 de mesurer la CMRGlu (Sokoloff, Reivich et al. 1977). L'analyse en TEP est donc le reflet du transport cellulaire du glucose et de sa phosphorylation par l'hexokinase sans pouvoir définir le rôle propre de chacun. Actuellement, en clinique humaine, le marqueur utilisé est le Fluor18 (18 Fluoro 2 Desoxy Glucose), qui émet des positons, qui sont alors détectés par une caméra à scintillations. Des algorithmes permettent alors la reconstruction locale des différentes concentrations des radioisotopes. En traumatologie crânienne, des études suggèrent en TEP une baisse du métabolisme du glucose comme Bergsneider et al. pour qui 77% des patients présentaient une baisse de la CMRGlu

dans la SG (Bergsneider, Hovda et al. 2000). Cependant, les études en TEP démontrent que le métabolisme du glucose reste relativement augmenté par rapport à la CMRO2 (Wu, Huang et al. 2013).

4. Conclusion

Le TC s'accompagne de désordres métaboliques marqués par une hypoxie tissulaire, une accumulation de lactate et une dysfonction mitochondriale. La délivrance tissulaire en oxygène est soit limitée (baisse du CBF, troubles microcirculatoires, trouble de la diffusion), soit mal utilisé (dysfonction mitochondriale). Ces éléments rendent le tissu cérébral particulièrement vulnérable à l'ischémie.

L'étude de différentes thérapeutiques agissant sur ces différents volets (œdème cérébral, hypoxie tissulaire, dysfonction mitochondriale et métabolisme cérébral) est donc essentielle afin de limiter les lésions scondaires post traumatiques et améliorer le pronostic des patients.

II. Thérapeutiques étudiées

A. Introduction

Actuellement, les traitements entrepris au décours d'un traumatisme crânien permettent uniquement de limiter l'apparition des lésions secondaires post traumatiques. La cascade excito toxique survenant précocement après les lésions primaires rend quasiment impossible l'administration de molécules permettant d'enrayer cette cascade afin de prévenir les lésions secondaires. La compréhension des mécanismes physiopathologiques sous tendant ces phénomènes permet d'avancer dans l'étude des thérapeutiques. En effet, la limitation des lésions ischémiques, hypoxiques ou des troubles métaboliques faisant suite au TC, pourraient permettre d'améliorer le pronostic neurologique des patients à court, moyen et long terme.

L'étude des mécanismes d'action de ces thérapeutiques est donc essentielle en recherche expérimentale afin de pouvoir appliquer ces traitements à l'homme par la suite.

B. Erythropoïétine

1. Généralités

L'Epo est une sialoglycoprotéine d'environ 30,4kDa, de la famille des cytokines de classe I, principalement produite par le rein. Initialement, sa principale fonction admise était de réguler l'oxygénation tissulaire par le contrôle du nombre d'érythrocytes. Sa synthèse est contrôlée par le facteur de transcription Hypoxia Inductible Factor (HIF) lui-même activé en conditions hypoxiques ou lors d'un stress oxydatif. En 1992, Tan et al. ont décrit la présence d'ARNm d'Epo au sein du tissu cérébral et démontré son augmentation à la suite d'une hypoxie (Tan, Eckardt et al. 1992). Au niveau cérébral, la présence d'Epo et de R-Epo (Récepteur de l'Epo) a pu être mise en évidence sur la plupart des cellules du SNC. Leur expression, induite par les phénomènes d'hypoxie, aboutit à la prolifération et la différenciation neuronale. Ainsi, chez des souris KO pour l'R-Epo, on note une dégénérescence neuronale par apoptose en plus de troubles de l'érythropoïèse permettant d'attribuer à l'Epo un rôle neurotrophique. L'Epo est majoritairement exprimée par les astrocytes alors que l'R-Epo se retrouve surtout au niveau neuronal. La liaison de l'Epo sur R-Epo favorise entre autres la survie neuronale constituant un système de neuroprotection endogène. Ce dernier est dépassé lorsque les lésions cérébrales sont trop importantes d'où l'idée d'apport d'Epo exogène lors d'accidents cérébraux majeurs. La composition de R-Epo n'est pas bien connue : homodimère R-Epo-R-Epo, hétérodimère R-Epo-Chaine β commune ou trimère R-Epo-R-Epo-Chaine β commune. Dans les neurones, la fixation de l'Epo sur R-Epo entraîne la phosphorylation et l'activation d'une enzyme, JAK2 kinase, initiant alors la transduction du signal par le biais de différentes voies de signalisation telles NFkB, ERK-1/-2 (Mitogen Activated Protein ou MAP kinase), STAT, PI3k. Les mécanismes déterminant le choix de la voie cellulaire ne sont pas encore connus. Ces voies conduisent à l'inhibition de signaux pro-apoptotiques et à l'activation de gènes favorables à la survie cellulaire (Siren, Fasshauer et al. 2009).

Parmi les molécules étudiées ces dernières années, la rhEpo a été utilisée dans différents modèles animaux (Ischémie cérébrale, anoxo ischémie néonatale, traumatismes médullaires…). Des études ont démontré son effet bénéfique dans la

diminution de l'OC post TC et son rôle anti apoptotique (Yatsiv, Grigoriadis et al. 2005, Verdonck, Lahrech et al. 2007, Liao, Zhi et al. 2008) via notamment des voies de signalisation type JAK2/STAT3 (Zhao, Li et al. 2011).

2. Effets au cours du traumatisme crânien

Sur l'œdème cérébral

En traumatologie crânienne, plusieurs résultats (Brines, Ghezzi et al. 2000, Yatsiv, Grigoriadis et al. 2005, Grasso, Sfacteria et al. 2007, Liao, Zhi et al. 2008, Xiong, Mahmood et al. 2010) soulignent une diminution du volume des lésions traumatiques et de l'OC chez des souris traitées par de l'Epo ainsi qu'une amélioration du score clinique neurologique, une réduction de la réaction inflammatoire cérébrale et une diminution des lésions de la BHE (Verdonck, Lahrech et al. 2007). Des résultats similaires ont été observés avec les dérivés carbamylés de l'Epo (CEpo) qui ne possèdent pas d'effets hématologiques propres (Mahmood, Lu et al. 2007, Adembri, Massagrande et al. 2008, Bouzat, Francony et al. 2011, Xiong, Mahmood et al. 2011). D'autres effets bénéfiques ont été décrits associés à l'Epo (antioxydant via la voie de signalisation Nrf2, antiinflammatoire, pro angiogénique, modificateur de l'activité microgliale, effet métabolique (Hartley, Varma et al. 2008)...). Tout ceci conduit à une amélioration des performances neurocognitives (Lu, Mahmood et al. 2005, Xiong, Lu et al. 2008). Cet effet anti œdémateux, a été décrit comme étant associé à une régulation des voies de signalisation ERK/Akt (Valable, Francony et al. 2010)

Sur l'hypoxie tissulaire

Aucune étude n'a actuellement évalué l'effet d'une injection de rhEpo sur l'hypoxie tissulaire post traumatique.

Sur la dysfonction mitochondriale

La rhEpo jouerait un rôle protecteur cellulaire par un mécanisme antiapoptotique en agissant au niveau des voies de signalisation cellulaire,

notamment au niveau de la voie RISK (Reperfusion Injury Salvage Kinase), et conduirait à l'inhibition de l'ouverture du mPTP. Ces interactions ont été étudiées au cours de travaux portant sur un modèle d'ischémie myocardique expérimental (Nishihara, Miura et al. 2007). L'effet anti apoptotique de la rhEpo dans ces modèles passerait par le d'une diminution du complexe ANT-CyclD avec élévation des formes phosphorylées de Akt, GS3Kβ et ERK (Kobayashi, Miura et al. 2008). Tamareille et al. observaient des résultats similaires. L'effet de la rhEpo était annulé par des inhibiteurs de PI3K et ERK ex vivo (Tamareille, Ghaboura et al. 2009). Nous avons précédemment démontré que l'action de la rhEpo pouvait passer par des voies moléculaires identiques au décours d'un TC diffus expérimental (Valable, Francony et al. 2010).

C. Mannitol

1. Généralités

Le mannitol est un sucre inerte de poids moléculaire 182kD. Après injection intraveineuse d'un bolus, les concentrations sanguines atteignent un pic avant de suivre une décroissance de type bicompartimentale. Sa demi-vie d'élimination est de 1 à 3 heures avec une grande variabilité interindividuelle. En l'absence d'insuffisance rénale, il n'existe pas d'accumulation plasmatique du mannitol, même en cas d'injections répétées. En revanche, une accumulation dans le LCR et dans le tissu cérébral en cas de lésions de la BHE a été décrite après administrations répétées de mannitol.

2. Effets au cours du TC

Sur l'œdème cérébral

Après une perfusion de mannitol (dose variant de 0.3 à 2 g/kg), il existe une augmentation de l'osmolarité plasmatique. La BHE intacte joue alors le rôle de membrane osmotique, les mouvements d'eau suivent le gradient osmotique du parenchyme cérébral vers le secteur intravasculaire. Ce mécanisme osmotique explique la diminution de la PIC de manière dose dépendante (Sorani, Morabito et al. 2008). Néanmoins cette théorie reste controversée, toutes les études n'étant pas d'accord sur cette diminution d'eau intracérébrale. Certaines études retrouvent une diminution de l'œdème dans la zone lésée (Bareyre, Wahl et al. 1997, Paczynski, He et al. 1997, Diringer, Scalfani et al. 2012), d'autres une diminution dans le cerveau sain mais pas dans le cerveau contus (Hartwell and Sutton 1993). Enfin, des études ne retrouvent pas de diminution de l'œdème (Inao, Kuchiwaki et al. 1990). Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par le fait que de très faibles variations d'eau intracérébrale, peuvent suffirent à diminuer le volume du parenchyme cérébral et avoir un effet sur la PIC (Paczynski, He et al. 1997).

Le mannitol a également un effet rhéologique. L'hémodilution induite par une perfusion de mannitol diminue la viscosité sanguine. Il existe aussi un effet sur la mécanique érythrocytaire, indépendant de l'hématocrite (Burke, Quest et al. 1981). Cette baisse de la viscosité diminue les résistances vasculaires cérébrales et augmente le DSC (Francony, Fauvage et al. 2008, Scalfani, Dhar et al. 2012, Nincevic, Mestrovic et al. 2015). Un effet aggravant l'œdème vasogénique initial en cas de lésions de la BHE a été également décrit (Kaufmann and Cardoso 1992). Cet effet n'est pas retrouvé par d'autres auteurs (von Berenberg, Unterberg et al. 1994). Il existe également un effet positif du mannitol sur la réactivité cérébro vasculaire (Tang, Lin et al. 2015)

Sur l'hypoxie tissulaire

L'effet du mannitol sur l'oxygénation cérébrale reste peu connu. Les études cliniques sont contradictoires. Certaines équipes retrouvent une amélioration à court terme de la saturation veineuse jugulaire en oxygène (SvJO2) après perfusion de mannitol au cours du TC (Fortune, Feustel et al. 1995, Cruz, Minoja et al. 2001, Cruz, Minoja et al. 2002, Cruz, Minoja et al. 2004). Gasco et al., de même que Bohman et al., retrouvent une amélioration de la PtiO2 après injection de mannitol chez les patients ayant une PIC élevée à la dose de 0.5g/kg (Gasco, Sendra et al. 2005, Bohman, Heuer et al. 2011). D'autres études utilisant la SvjO2 ou des mesures locales de SO2 telles que la PtiO2, ne montrent aucun effet bénéfique sur la saturation tissulaire en oxygène (Hartl, Bardt et al. 1997, Kiening, Hartl et al. 1997, Unterberg, Kiening et al. 1997, Oddo, Levine et al. 2009, Helbok, Kurtz et al. 2011). La méthode par spectroscopie en proche infra-rouge (NIRS) n'a pas mis en évidence d'amélioration de l'oxygénation cérébrale après traitement par mannitol à la dose de 1g/kg (Buchner, Meixensberger et al. 2000).

Sur le métabolisme cérébral

Les études cliniques en microdialyse cérébrale ne sont pas consensuelles. Certaines ne notent pas de modification du métabolisme oxydatif après administration de 0.3 à 0.5 g/Kg de mannitol (Sakowitz, Stover et al. 2007), contrairement à l'article de Helbok et al. mettant en évidence une diminution du pic lactate/pyruvate et donc une diminution du métabolisme anaérobie après une dose de 1g/kg (Helbok, Kurtz et al. 2011).

D. Lactate de sodium

1. Généralités

Des travaux expérimentaux récents suggèrent que la dysfonction métabolique cérébrale post traumatique constituerait un facteur déterminant physiopathologique et pronostique après un TC (Glenn, Kelly et al. 2003, Xu, McArthur et al. 2010). Le glucose représente le substrat énergétique essentiel pour le fonctionnement cérébral, cependant d'autres substrats sont également capables d'être utilisés par le cerveau. Schurr et al. furent les premiers à décrire le lactate endogène en tant que substrat énergétique alternatif dans une culture cellulaire de neurones (Schurr, West et al. 1988). Le lactate ne serait pas uniquement un simple produit « déchet » du métabolisme anaérobie mais aussi un substrat énergétique complémentaire d'où l'idée d'un apport de lactate exogène au décours d'un TC.

2. Apport de lactate exogène

Plusieurs travaux expérimentaux ont suggéré l'intérêt d'une administration post traumatique de lactate hypertonique exogène (Aramendi, Manzanares et al. 2016). Dans des modèles expérimentaux de TC, une perfusion de lactate a entrainé une amélioration des performances cognitives post-traumatiques (Rice, Zsoldos et al. 2002, Holloway, Zhou et al. 2007). Dans un modèle d'ischémie cérébrale, une meilleure évolution neurologique a pu être également observée chez des rats par un traitement par lactate exogène (Berthet, Lei et al. 2009). Dans un modèle de TC par impact cortical contrôlé, une perfusion de lactate chez des rats améliorait le DSC, diminuait le volume lésionnel et améliore la consommation cérébrale en oxygène probablement en améliorant la dysfonction mitochondriale post traumatique (Levasseur, Alessandri et al. 2006, Alessandri, Schwandt et al. 2012). Chez des patients atteints de TC grave, le lactate de sodium semi-molaire a montré une diminution des poussées d'HTIC (Ichai, Payen et al. 2013). Dans une étude récente, l'administration de lactate de sodium exogène chez des patients traumatisés

crâniens permettait d'observer une modulation de la dysfonction métabolique cérébrale post traumatique avec une amélioration de la biodisponibilité des substrats énergétiques de base (Glucose, pyruvate) et une diminution de la PIC (Bouzat, Sala et al. 2014). De par son effet hypertonique (lactate de sodium semi molaire : Na 504 mmol/L et L-lactate 504.1 mmol/L ou lactate de sodium molaire : Na 1000 mmol/L et L-lactate 1000 mmol/L), le lactate de sodium possède également un effet anti œdémateux (Ichai, Armando et al. 2009) et le lactate en lui même agit comme un vasodilatateur (Shackford, Zhuang et al. 1992, Attwell, Buchan et al. 2010). Cependant pour Prieto et al., la déplétion énergétique secondaire à un TC grave ne serait pas améliorée par une administration de lactate exogène (Prieto, Tavazzi et al. 2011). L'administration de lactate exogène pourrait être déterminée par des paramètres métaboliques individuels, déterminés en microdialyse cérébrale notamment le rapport lactate/pyruvate (Quintard, Patet et al. 2016). Un effet bénéfique sur les performances neurocognitives des patients atteints d'un TC modéré a été décrit également en recherche clinique (Bisri, Utomo et al. 2016). Ceci met en évidence le bénéfice probable d'une administration de lactate exogène sur le métabolisme cérébral en tant que substrat complémentaire énergétique nécessaire au fonctionnement de base du cerveau lorsque les ressources énergétiques de ce dernier sont dépassées à la suite d'un TC.

E. Conclusion

Aux vues de la littérature, l'érythropoïétine, le mannitol et le lactate de sodium hypertonique ont chacun des propriétés qui peuvent agir sur l'œdème cérébral, l'hypoxie tissulaire et la dysfonction mitochondriale post traumatique. Nous avons fait l'hypothèse que des effets anti oedémateux de la rhEpo, de la CEpo, du mannitol et du lactate de sodium en levant les contraintes mécaniques macro/microvasculaires et/ou par des effets vasodilatateurs pourrait améliorer la délivrance tissulaire en oxygène et/ou corriger le dysfonctionnement énergétique.

L'ensemble des travaux présentés résulte d'un travail d'équipe, réalisé au sein de l'équipe 5 du GIN avec l'aide de différents collaborateurs de l'équipe 5 ou de laboratoires associés mentionnés ci dessous. Toutes les acquisitions IRM ont été réalisées sur la plateforme IRM de Grenoble (UMS IRMaGe).

Dans la partie « Etudes réalisées », suite à une présentation des techniques communes, nous ferons une courte introduction sur chaque étude. Nous énoncerons ensuite les hypothèses qui nous ont conduits à réaliser ce travail, avant de faire un point sur certaines techniques précises utilisées dans chaque étude. Les autres techniques utilisées et autres détails sur l'étude sont présents dans les papiers joints. L'introduction de chaque étude permet de comprendre la suite logique nous ayant conduit au cours des années, à la réalisation successive de chaque recherche expérimentale.

III. Etudes réalisées

A. Méthodes communes

1. Modèle animal

Le protocole expérimental a utilisé des rats Wistar mâles (350-500g) au sein d'une animalerie du GIN, dans le respect des règles éthiques de l'expérimentation animale (élevage Janvier, Le Genest Saint-Isle, France). Les animaux avaient de l'eau et de la boisson *ad libitum* dans un environnement à température contrôlé (20-22°C). Les expériences ont été approuvées par le comité d'éthique local du GIN en accord avec les réglementations françaises et la directive du Conseil de la Communauté Européenne du 24 Novembre 1986 sur la protection des animaux utilisés en expérimentation. Un comité d'éthique national a également approuvé les expériences à partir de celles réalisées depuis 2015.

2. Modèle de traumatisme crânien

Le modèle de TC est celui de "l'impact-accélération", responsable d'un OC diffus dans les 3 1ères heures après le TC sans fracture du crâne ni contusion hémorragique (Marmarou, Foda et al. 1994). Ce modèle a été validé dans notre laboratoire par des scores histologiques de lésion cérébrale et par une altération de l'atteinte neurocomportementale objectivée par un score clinique. Il offre l'avantage de se rapprocher du TC diffus en clinique (lésions axonales diffuses sans lésion focale) puisqu'il reproduit cette atteinte diffuse sans procédure invasive. Le rat est anesthésié, ventilé mécaniquement, en décubitus ventral sur un berceau de mousse semi-rigide. Une masse métallique de 500 g est lâchée de 1,5 m de haut à travers un tube en plexiglas et provoque un impact sur le crâne de l'animal via une pastille de laiton collée entre les sutures lambda et bregma. La tête fait alors un mouvement rapide de flexion-extension à l'origine de lésions axonales diffuses et d'un OC

réactionnel. L'heure de référence H0 était l'heure du traumatisme chez les rats TC ou un temps équivalent chez les rats sham (Figure 15).

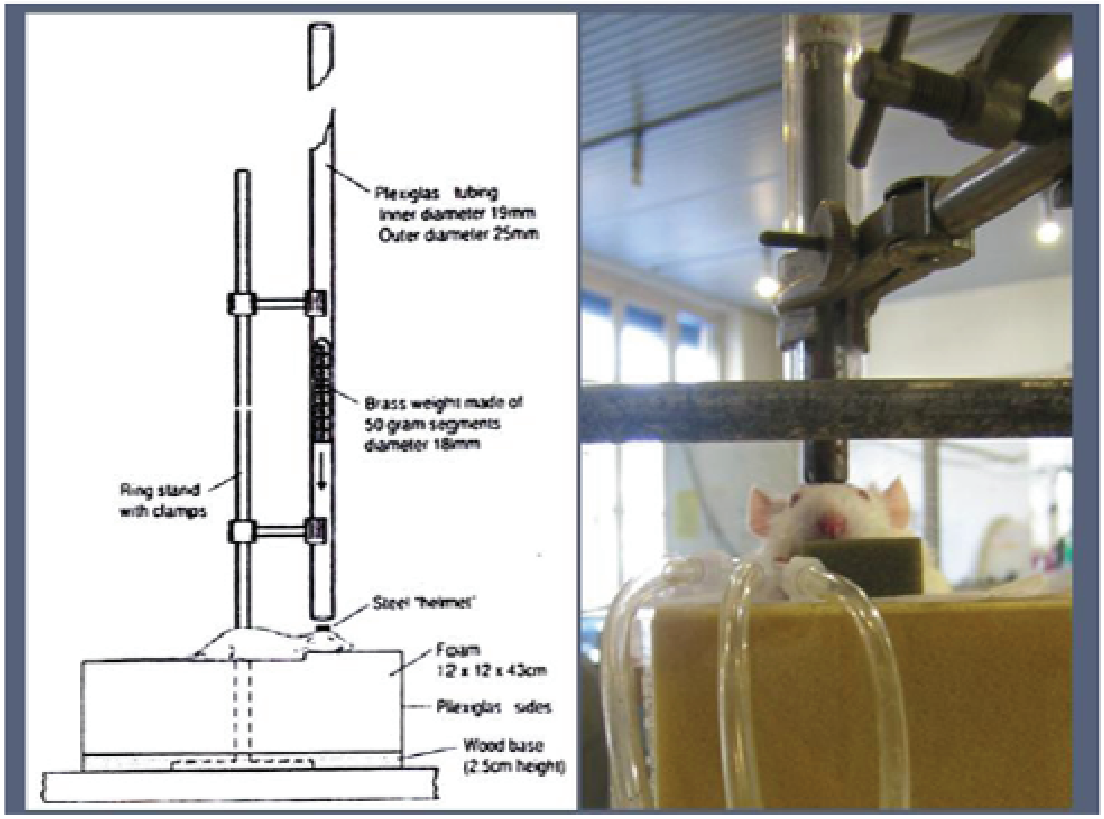


Figure 15: TC de type impact accélération

3. Préparation des animaux

Sous anesthésie générale par Isoflurane (2,5%) dans une cage d'induction, le rat était intubé ventilé (cathéter 20G) puis équipé d'une voie veineuse centrale (cathéter 22G) et d'une voie artérielle (cathéter 22G) en position fémorale. Une voie veineuse périphérique était également positionnée sur la queue de l'animal (cathéter 22G). La pression artérielle, les gaz du sang artériel, le taux d'hémoglobine et la température corporelle ont été régulièrement mesurés. Les critères d'exclusion de l'étude étaient : PAM (< 70 mm Hg), PaO_2 (< 100 mm Hg), $PaCO_2$ (< 30 mm Hg or > 45 mm Hg), et hémoglobine (< 80 g/L).

B. Méthodes spécifiques

1. Etude 1 : Effet de la rhEpo dans un modèle de TC diffus sur l'œdème cérébral et l'hypoxie tissulaire.

a. Justification

Au cours d'un TC survient un œdème cérébral précoce avec hypoxie tissulaire, responsables de la morbimortalité des patients. Cette hypoxie tissulaire est en rapport avec des troubles macrocirculatoires (baisse du DSC), microcirculatoire (anomalies de la diffusion en O2 aux tissus) ou métaboliques.

La rhEpo a démontré précédemment des propriétés anti oedémateuses pouvant, selon nos hypothèses, potentiellement permettre d'améliorer l'oxygénation tissulaire cérébrale par un effet de levée des contraintes vasculaires de l'œdème sur la macro ou microcirculation.

Dans une première étude, nous avons testé l'effet de l'érythropoïétine recombinante humaine (rhEpo) sur l'œdème cérébral et l'hypoxie cérébrale post traumatique par IRM. L'œdème cérébral et la saturation tissulaire en oxygène ont été mesurés par IRM de diffusion avec mesure du coefficient apparent de diffusion de l'eau (ADC) et de la ISO2 par effet BOLD en IRM avant le TC et à H2 post TC. L'œdème cérébral était étudié également en microscopie électronique à H2 du TC après sacrifice des animaux. L'hypoxie cérébrale était évaluée par la mesure de la pression tissulaire en oxygène lors d'une deuxième série d'expériences.

b. Hypothèses

Nos hypothèses étaient que :

- A la suite du TC diffus survenait un œdème cérébral entrainant une hypoxie tissulaire
- La rhEpo permettait de diminuer cet œdème et ainsi l'hypoxie tissulaire cérébrale
- La caractérisation de l'état micro et macrovasculaire cérébral post TC par microscopie électronique et IRM respectivement, nous aiderait à comprendre le mécanisme d'action de la rhEpo

c. *Aspects spécifiques méthodologiques*

Thérapeutique étudiée

Dans la première étude, la rhEpo était injectée en IV 30 min après le TC à la dose de 5000 UI/Kg. Dans le groupe Sham, un délai de 30 min était respecté avant l'injection de rhEpo après la fin de préparation de l'animal (Groupes TC-rhEpo et sham-rhEpo). Les autres groupes recevaient du NaCl 0,9% 0.5 ml en IVD 30 minutes après le TC ou son horaire présumée (Groupes TC-saline et sham-saline). Les animaux des deux groupes sham ont été réunis en un seul groupe sham comme aucune différence n'était notée entre les rats de ces 2 groupes.

Saturation tissulaire en O2 (ISO2), temps de transit moyen (TTM), volume sanguin cérébral (BVf) IRM

Nous avons choisi d'étudier l'oxygénation tissulaire cérébrale par une évaluation en IRM, suite à la mise en place de la technique de quantification de l'effet BOLD (Blood Oxygen Level Dependent) dans notre équipe (Christen, Lemasson et al. 2011). Cette technique permet une approche plus diffuse et moins invasive que d'autres méthodes de monitorage, pouvant être répétée dans le temps. Des séquences permettant d'analyser la ISO2 étaient effectuées à H1 et H2 post TC (MSME, carte B0 et T2*) sur l'IRM 7T. Les régions d'intérêts concernaient le cerveau entier excluant les ventricules et le corps calleux sur trois coupes IRM de 1mm en coupes transversales centrées sur les deux ventricules latéraux.

L'étude complémentaire du BVf et du TTM permettent une analyse des caractéristiques macrovasculaires du tissu cérébral post traumatique in vivo. Ces données permettent d'obtenir une évaluation du DSC permettant de comprendre l'impact du TC sur la macrocirculation et l'effet des thérapeutiques étudiées sous réserve d'un contrôle des ACSOS. Ces séquences étaient associées à une séquence de perfusion utilisant une injection par voie intra veineuse de nanoparticules d'oxyde de fer (P0904®, Guerbet, France) à H2 du TC. Les données ont été étudiées selon les mêmes logiciels que pour le traitement de la ISO2 avec calcul de la ISO2 (%), du TTM (s) et du BVf (%) à H2 sur un moyennage des 4 zones d'intérêt.

PtiO2

Une sonde de PtiO2 était insérée immédiatement après le TC ou horaire équivalent chez les sham. La zone d'insertion correspondait aux régions d'intérêts en IRM. La fonctionnalité de la sonde était évaluée grâce à une épreuve d'augmentation progressive de la FiO2. Les valeurs de PtiO2 étaient alors recueillies à H2 après une période d'équilibration et avec des paramètres stables en PaO2, PaCO2, hémoglobine, température et pression artérielle moyenne (Figure 16).

Figure 16: Mesure de la PtiO2 sur un rat en laboratoire

Microscopie électronique

Cette série d'expériences a été réalisée en collaboration avec la plateforme de microscopie électronique de l'Institut des Neurosciences grâce à l'aide du Dr Karin Pernet Gallay, de Julie Delaroche et de Anne Bertrand.

Cette analyse en microscopie électronique permet une évaluation morphologique tissulaire précise permettant de caractériser les composantes microvasculaires du tissu cérébral, d'obtenir une localisation cellulaire précise et ainsi de déterminer les mécanismes d'action des molécules étudiées.

Les rats étaient sacrifiés en fin d'expérience par décapitation (n = 1 rat par groupe). Les cerveaux étaient rapidement retirés et des coupes de cortex (n = 3 par rat) étaient fixées, incubées et déshydratées. Les images étaient acquises à l'aide d'une caméra digitale. L'analyse de l'œdème cérébral comportait l'étude de 15 images de coupes de capillaires sur chaque échantillon de manière aveugle également. Les résultats étaient exprimés en pourcentage de capillaires normaux sans œdème et de capillaires entourés d'œdème sur plus de 50% de leur surface sur le nombre de capillaires total observé sur la coupe (Figure 17).

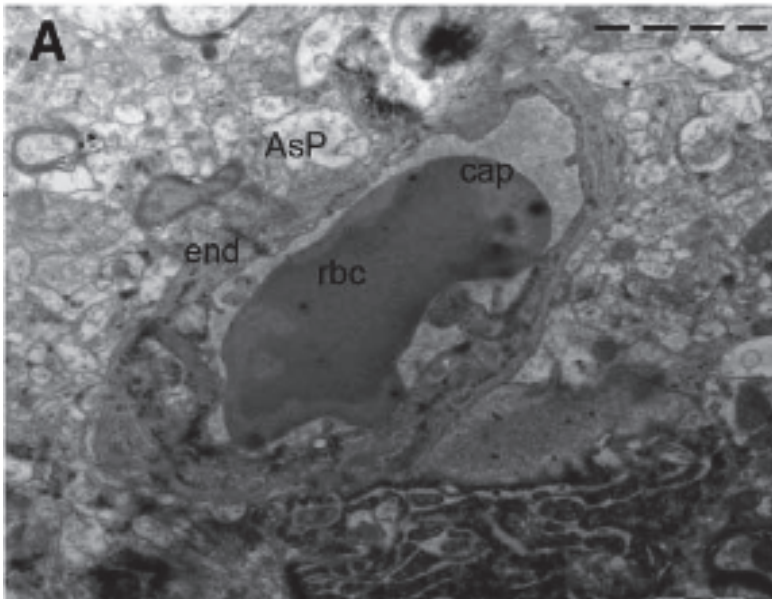


Figure 17: Images de microscopie électronique de capillaires entourés d'œdème astrocytaire

Mon rôle dans ce travail a consisté en la réalisation des manipulations IRM avec le Dr Pierre Bouzat (Assistant-Chef de Clinique au Pôle Anesthésie Réanimation) lors d'un stage M2R en 2010-2011, en l'installation de la technique d'extraction mitochondriale et la réalisation des tests des fonctions mitochondriales avec l'aide du Dr Cécile Batandier du laboratoire de bioénergétique fondamentale et appliquée INSERM U1055 à St Martin d'Hères, ainsi qu'une aide dans le traitement et l'analyse des données.

Changes in Brain Tissue Oxygenation After Treatment of Diffuse Traumatic Brain Injury by Erythropoietin*

Pierre Bouzat, MD[1,2,3]; Anne Millet, MD[1,2,4]; Yvonnick Boue, MD[1,2,3]; Karin Pernet-Gallay, PhD[1,2]; Thibaut Trouve-Buisson, MD[1,2,3]; Lucie Gaide-Chevronnay, MD[1,2,3]; Emmanuel L. Barbier, PhD[1,2]; Jean-Francois Payen, MD, PhD[1,2,3]

Objectives: To investigate the effects of recombinant human erythropoietin on brain oxygenation in a model of diffuse traumatic brain injury.

Design: Adult male Wistar rats.

Setting: Neurosciences and physiology laboratories.

Interventions: Thirty minutes after diffuse traumatic brain injury (impact-acceleration model), rats were intravenously administered with either a saline solution or a recombinant human erythropoietin (5000 IU/kg). A third group received no traumatic brain injury insult (sham-operated).

Measurements and Main Results: Three series of experiments were conducted 2 hours after traumatic brain injury to investigate: 1) the effect of recombinant human erythropoietin on brain edema using diffusion-weighted magnetic resonance imaging and measurements of apparent diffusion coefficient ($n = 11$ rats per group); local brain oxygen saturation, mean transit time, and blood volume fraction were subsequently measured using a multiparametric magnetic resonance–based approach to estimate brain oxygenation and brain perfusion in the neocortex and caudoputamen; 2) the effect of recombinant human erythropoietin on brain tissue P_{O_2} in similar experiments ($n = 5$ rats per group); and 3) the cortical ultrastructural changes after treatment ($n = 1$ rat per group). Compared with the sham-operated group, traumatic brain injury saline rats showed a significant decrease in local brain oxygen saturation and in brain tissue P_{O_2} alongside brain edema formation and microvascular lumen collapse at H2. Treatment with recombinant human erythropoietin reversed all of these traumatic brain injury–induced changes. Brain perfusion (mean transit time and blood volume fraction) was comparable between the three groups of animals.

Conclusion: Our findings indicate that brain hypoxia can be related to microcirculatory derangements and cell edema without evidence of brain ischemia. These changes were reversed with post-traumatic administration of recombinant human erythropoietin, thus offering new perspectives in the use of this drug in brain injury. (*Crit Care Med* 2013; 41:1316–1324)

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

Patients with severe traumatic brain injury (TBI) are treated by strict avoidance of conditions known to aggravate primary brain injury, such as arterial hypotension, hypertension, systemic hypoxia, hypercapnia, or severe hypocapnia. The prevention of elevated intracranial pressure (ICP) and the maintenance of an appropriate cerebral perfusion pressure (CPP) are widely applied measures to minimize ischemic insult (1). However, recent studies have

***See also p. 1380.**

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

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's website (http://journals.lww.com/ccmjournal).

Drs. Bouzat, Barbier, and Payen designed the investigation. Drs. Bouzat, Millet, Boue, Pernet-Gallay, Trouve-Buisson, Gaide-Chevronnay, and Barbier performed the investigation. Drs. Bouzat, Millet, Boue, Pernet-Gallay, and Payen analyzed data. Drs. Bouzat, Barbier, and Payen wrote the paper.

Supported, in part, by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Fondation des Gueules-Cassées, Association pour la Recherche en Néonatologie, and Ministère de l'Education, de la Recherche et de la Technologie, France.

Dr. Payen consulted for Biocodex, S.A., Baxter; has received grant support from Hutchinson Tech., Novonordisk; and received payment for lectures from Abbott, LFB, GE Healthcare, and Integra Lifescience. The remaining authors have not disclosed any potential conflicts of interest.

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

Copyright © 2013 by the Society of Critical Care Medicine and Lippincott Williams & Wilkins

DOI: 10.1097/CCM.0b013e31827ca64e

demonstrated that episodes of brain hypoxia as assessed by brain tissue PO_2 ($PbtO_2$) probes are common despite optimization of CPP and are independently associated with poorer patient outcomes (2, 3). Aggressive treatment of low $PbtO_2$ was associated with improved outcome compared with standard ICP/CPP-directed therapy in cohort studies of severely head-injured patients (4, 5). In addition, $PbtO_2$ could be primarily influenced by factors governing oxygen diffusion rather than total oxygen delivery (6). Collectively these findings suggest that brain tissue hypoxia, as reflected by low $PbtO_2$, cannot be viewed as a simple consequence of macrovascular ischemic insult but may reflect a more complex interaction between the injured tissue and its microvascular environment.

The transportation of oxygen into the brain tissue is driven by a diffusion gradient in oxygen concentration between the blood and cell. Neurovascular coupling, the range of mechanisms that adjust arteriolar tone according to local metabolic needs, represents the basis of our current understanding on how this is achieved. It is also clear that the spatial organization of the vascular system is a key factor in maintaining effective oxygen transportation (7, 8). In injured brain, the balance between oxygen demand and supply can be disrupted as a result of increased brain metabolism, reduction in cerebral blood flow, and/or disturbances in the microcirculation. Ultrastructural studies of brain microvessels after traumatic contusions have reported the occurrence of endothelial edema, microvascular collapse, and perivascular swelling (9, 10). The compression of microvessels by swollen glial-foot processes and/or their obstruction by microthromboses have been found responsible for pericontusional ischemia (11–13). In patients with TBI, such microvascular damage accounted for the inability of pericontusional tissue to increase the oxygen extraction fraction (OEF) in response to moderate hypocapnia-induced hypoperfusion (14). Therefore, despite no evidence of frank cerebral ischemia, microvascular ischemia might develop after traumatic contusion and is characterized by increased barriers to the diffusion of oxygen that reduce cellular oxygen delivery (14). Whether such relations among microcirculation disturbances, tissue edema, and brain hypoxia exist without traumatic contusion is unknown.

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

MATERIALS AND METHODS

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

In the second series of experiments, brain tissue P_{O_2} ($PbtO_2$) was assessed at H2 using a $PbtO_2$ probe inserted into the cortex otherwise following the same experimental protocol ($n = 5$ rats per group). In the third series of experiments following the same experimental protocol, ultrastructural analysis was conducted at H2 with one rat per group.

Experimental Protocol

The study design was approved by the local Internal Evaluation Committee for Animal Welfare and Rights. Experiments were performed in accordance with French Government guidelines (licenses 380819 and A3851610008). The experimental protocol was similar to that previously described (19). Anesthesia was induced and maintained with isoflurane (expired fraction of 2%) throughout the study period. After tracheal intubation, rats were mechanically ventilated with 60% air–40% oxygen using a rodent ventilator (SAR-830/P, CWE, Ardmore, PA). Rectal temperature was maintained at 36.5°C ± 0.5°C. Catheters were inserted into the femoral artery and vein to allow the monitoring of mean arterial blood pressure (MABP) and the delivery of drugs. Blood gases (PaO_2 and $PaCO_2$), arterial oxygen saturation of hemoglobin (SaO_2), arterial pH (pHa), and hemoglobin content were determined from arterial blood samples of less than 0.1 mL (ABL 510, Radiometer, Copenhagen, Denmark). Exclusion criteria were the persistence for at least 10 minutes of out-of-range values for the following physiological parameters: MABP less than 60 mm Hg, PaO_2 less than 100 mm Hg, $PaCO_2$ less than 30 mm Hg or greater than 45 mm Hg, and hemoglobin content less than 80 g/L. Injury was induced by dropping a 500g mass through

a vertical cylinder from a height of 1.5 m onto a metallic disc glued to the skull, according to the impact-acceleration model (23). The reference time (H0) corresponded to the moment of impact (TBI-EPO and TBI-saline) or to an equivalent time (sham-operated). At 30 minutes after H0, rats were intravenously administered either 0.5 mL of an isotonic saline solution (TBI-saline) or 5000 IU/kg of Epoetin alfa (Eprex, Janssen-Cilag Division Ortho Biotech, Issy-les-Moulineaux, France) diluted in 0.5 mL of saline solution (TBI-EPO). The sham-operated rats were similarly treated but were not subjected to TBI.

MRI

MRI experiments were performed at B_0 = 4.7T, in a horizontal bore magnet (Biospec 47/40 USR AV III, Bruker BioSpin, Wissembourg, France) equipped with actively shielded gradient coils generating gradients of up to 660 mT/m in 120 µs. We used a volume and surface cross coil configuration. The protocol for MRI acquisition included successive sequences to assess brain edema using diffusion-weighted imaging, local brain oxygen saturation using a multiparametric quantitative blood oxygenation level-dependent (BOLD) approach (24), cerebral perfusion using a dynamic susceptibility approach allowing the determination of mean transit time (MTT) of an intravenously injected contrast agent (25) and blood volume fraction (BVf) using a steady-state approach (26) (**supplemental data**, Supplemental Digital Content 1, http://links.lww.com/CCM/A606).

MRI Analysis

Blood Volume Fraction. BVf was estimated using the previously described steady-state approach (26):

$$\mathrm{BVf} = \frac{3}{4\pi\gamma\Delta_{\chi_{\mathrm{USPIO}}}B_0}\cdot\left(\frac{1}{T^*_{2\ \mathrm{after}}}-\frac{1}{T^*_{2\ \mathrm{before}}}\right) \quad [1]$$

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

Tissue lSO$_2$. Local brain oxygen saturation (lSO_2) maps were obtained using the approach we previously described (24, 28). A T_2 map was derived from the data obtained with the two-dimensional multiple spin-echo sequence via a nonlinear fit of monoexponential decay. To correct for the macroscopic inhomogeneity of B_0, the three-dimensional multiple gradient-echo was spatially averaged. Thereby, a multiple gradient-echo dataset with a spatial resolution matching that of the T_2 and of the BVf maps was obtained. The following equation was fitted pixelwise to the MR signal decay collected at echo times over 10 ms from the multiple gradient-echo dataset using T_2 and BVf from the corresponding maps (24):

$$s(t) = \mathrm{Cte}\cdot\exp\left(-\frac{1}{T_2}\cdot t - \mathrm{BVf}\gamma\frac{4}{3}\pi\Delta_{\chi_0}Hct\left(1-lSO_2\right)B_0t\right) \quad [2]$$

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

MTT was calculated from the calculation of $R_2^*(t)$:

$$\Delta R_2^*(t) = \frac{1}{\mathrm{TE}}\ln\left(\frac{S(t)}{S_0}\right) \quad [3]$$

where $S(t)$ refers to the signal, TE to the echo-planar imaging (EPI) echo time, and S_0 to the baseline amplitude before injection of contrast agent. The gamma-variate function was then fitted to $R_2^*(t)$ using a nonlinear Levenberg–Marquardt algorithm:

$$c(t) = K(t-t_0)^{\alpha}e^{\left(-\frac{t-t_0}{\beta}\right)} \quad [4]$$

α, β, t_0 and K are the parameters, thereby adjusted. MTT was computed pixelwise as the first moment of the gamma-variate.

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

Brain Tissue PO$_2$ Measurement

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

Ultrastructural Analysis

In the third series of experiments, rats were sacrificed by decapitation at H2 post-injury. Brains were rapidly excised and cortex samples (n = 3 per rat) fixed in 2.5% glutaraldehyde (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4) for 24 hour at room temperature. Samples were then post-fixed in 1% osmium tetroxide (0.1 M cacodylate, pH 7.2) for 1 hour at 4°C and stained with 1% uranyl acetate (pH 4) in water for 1 hour at 4°C and dehydrated through graded alcohol concentrations before being embedded in Epoxy Embedding Medium (Fluka, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Cortex brain ultrathin sections (60 nm thickness) were

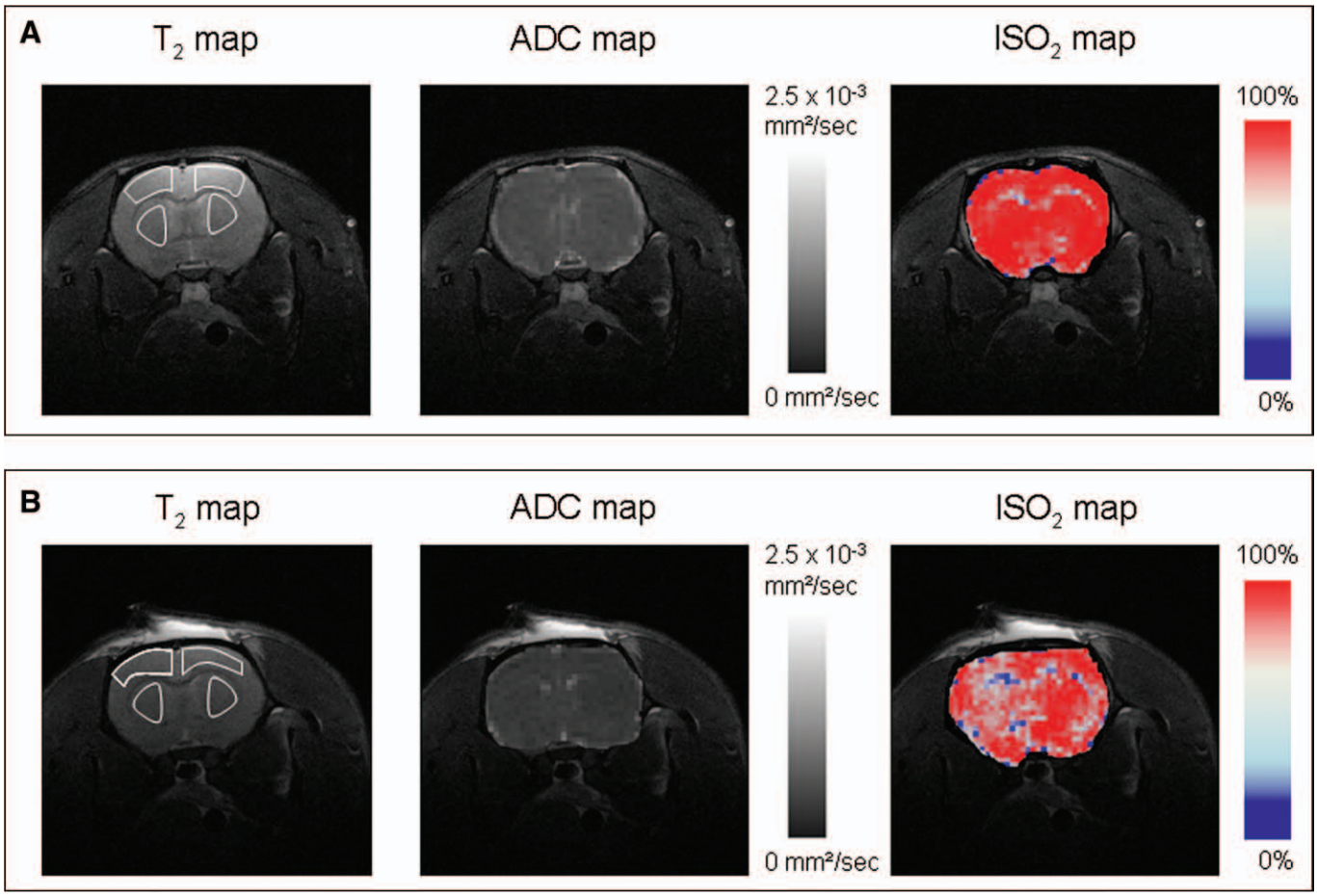


Figure 1. Representative T_2-weighted (*left*) image, apparent diffusion coefficient (ADC) map (*center*), and ISO_2 map (*right*) at H2 in a rat from the sham-operated group (**A**) and another following diffuse traumatic brain injury (TBI) (**B**). The two regions of interest, neocortex and caudoputamen, are delineated in each hemisphere from the T_2-weighted image.

stained with 5% uranile acetate and 0.4% lead citrate before being observed under a transmission electron microscope at 80 kV (Jeol 1200 EX, JEOL Ltd, Tokyo, Japan). The analysis was performed on three cortex samples per rat and at least 15 images of capillary cross sections were acquired for each sample. Images were acquired with a digital camera (Veleta, SIS, Olympus, Munster, Germany).

Statistical Analysis

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

RESULTS

In the first series of experiments, no differences in physiological parameters were found between the three groups of animals regarding MABP, PaO_2, $PaCO_2$, arterial pH, temperature, and hemoglobin content (**Table 1**). Averaged ADC of the four regions of interest was significantly reduced at H2 in the TBI-saline group in comparison with their baseline values: ΔADC = –11% ± 3% (ΔADC = ADC at H2 – ADC at H0/ADC at H0) ($p < 0.01$). Conversely, no significant ADC changes were found for TBI-EPO and sham-operated groups at H2: –4% ± 9% and 2% ± 4%, respectively ($p < 0.05$ vs. TBI-saline; **Fig. 2*A***). Meanwhile, lSO_2 values obtained at H2 were significantly lower in the TBI-saline group by comparison with the two other groups: 71% ± 8% vs. 79% ± 6% and 79% ± 10% in the TBI-EPO and sham-operated groups, respectively ($p < 0.05$ vs. TBI-saline; Fig. 2B). BVf values of the four regions of interest were no different between the three groups: 4.3 ± 0.9 mL/100 mL, 4.8 ± 1.2 mL/100 mL, and 5.0 ± 1.2 mL/100 mL of brain tissue in the TBI-saline, TBI-EPO, and sham-operated groups, respectively (**Fig. 3*A***). Similarly, MTT values did not differ between the three groups: 1.1 ± 0.3 s, 1.1 ± 0.3 s, and 0.9 ± 0.2 s, respectively (Fig. 3*B*).

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

TABLE 1. Physiological Data From the Three Groups of Rats Undergoing MRI: Sham-Operated ($n = 11$), Traumatic Brain Injury (TBI) With Saline ($n = 11$), TBI With Recombinant Human Erythropoietin ($n = 11$)

Variables	Sham-Operated	Traumatic Brain Injury-Saline	Traumatic Brain Injury-Recombinant Human Erythropoietin
Mean arterial blood pressure (mm Hg)	117±20	108±15	110±13
PaO_2 (mm Hg)	119.0±11.8	108.4±6.4	110.0±7.2
$PaCO_2$ (mm Hg)	36.6±3.3	35.2±2.7	35.0±0.8
Arterial pH	7.41±0.02	7.39±0.01	7.40±0.05
Temperature (°C)	36.6±0.5	36.3±0.4	36.4±0.8
Hemoglobin (g/L)	120±18	117±17	118±13

Data were collected 1 hr after the TBI impact (or equivalent time in sham-operated rats). Data are expressed as mean ± SD.

The third series of experiments, investigating the ultrastructural morphology of the capillaries, showed no change in endothelial cells, tight junctions, or basal lamina following the insult compared with the sham-operated animal (**Fig. 5*A–C***). However, only 6% (4/65) of the capillaries appeared normal after TBI with over 90% (60/65) being surrounded by edema and appearing electron lucent with electron microscopy. The edema was unambiguously located in the foot processes and cell bodies of astrocytes. It covered more than half of the surface of the capillary and had resulted in a collapsed lumen in 68% of the studied capillaries (44/65). Treatment by rhEPO reversed these ultrastructural changes: 33% of capillaries had edema covering more than half of the capillary surface and 50% of the capillaries (21/42) appeared normal (Fig. 5D).

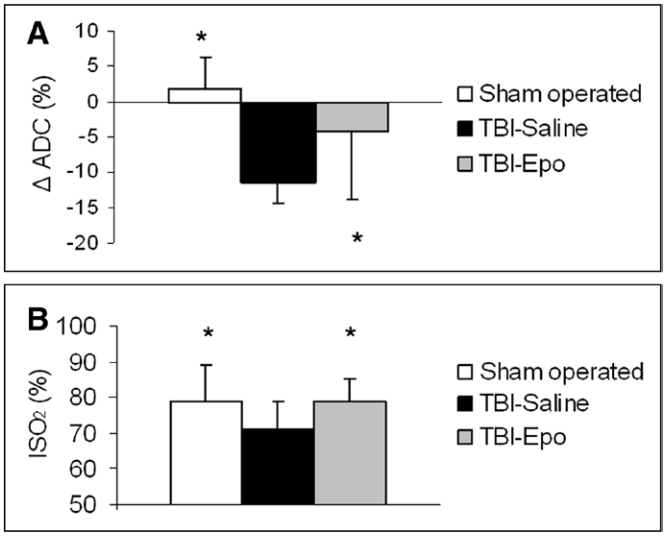


Figure 2. A, Changes (in percent) in averaged apparent diffusion coefficient (ΔADC) values of water in the neocortex and caudoputamen (four regions of interest) between baseline and 2 hr (H2) after traumatic brain injury (TBI) in three groups of rats ($n = 11$ rats per group): sham-operated, TBI-saline, and TBI-erythropoietin (EPO). **B**, Average local tissue oxygen saturation (lSO_2) of the four brain regions of interest in the three groups of animals at H2. *$p < 0.05$ vs. TBI-saline.

DISCUSSION

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

Local brain oxygen saturation was estimated using a multiparametric quantitative BOLD-MR-based approach. This approach was successfully incorporated to allow the quantitative evaluation of hemodynamic parameters such as cerebral

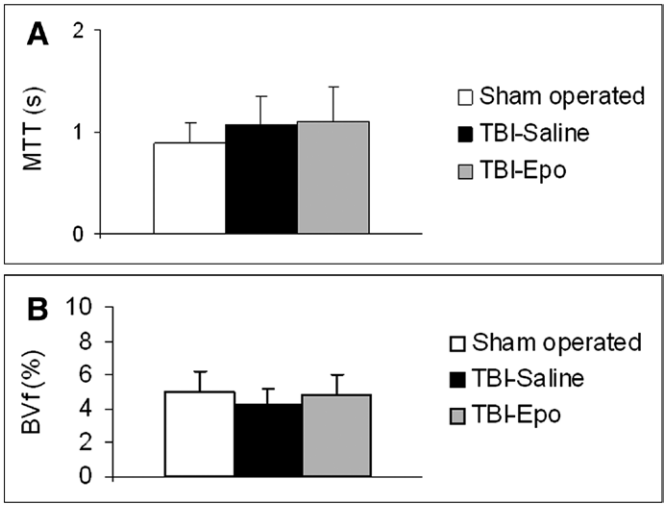


Figure 3. Average mean transit time (MTT) (**A**) and average cerebral blood volume (BVf) (**B**) of the four regions of interest obtained 2 hr after trauma (or equivalent time) in the three groups of rats ($n = 11$ per group): sham-operated, traumatic brain injury (TBI)-saline, and TBI-erythropoietin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

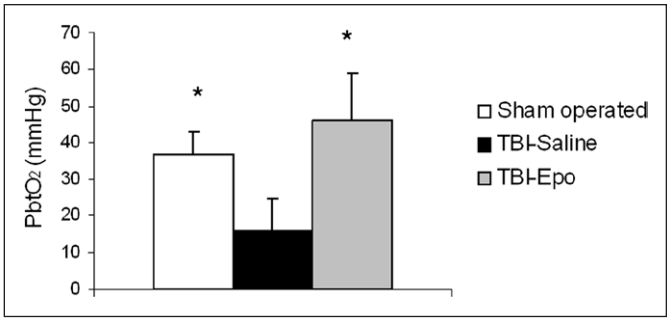


Figure 4. Brain tissue oxygenation ($PbtO_2$) values obtained 2 hr after trauma (or equivalent time) in the three groups of rats ($n = 5$ per group): sham-operated, traumatic brain injury (TBI)-saline, and TBI-erythropoietin (EPO). *$p < 0.05$ vs. TBI-saline.

blood volume, deoxyhemoglobin concentration, and OEF (30) and was applied to map brain oxygenation in models of stroke and brain tumor (31, 32). Our MRI protocol combined the multiparametric quantitative BOLD approach with cerebral blood volume measurements during a steady-state approach to estimate local tissue oxygenation within the microvasculature, that is, arterial and venous capillaries (24). This technique assumes that the difference between T_2 and T_2^* is ascribed to the amount of deoxyhemoglobin within the voxel, that is, Hct × BVf (1–lSO_2). This is not verified in the presence of large B_0 heterogeneities or other sources of magnetic susceptibility changes such as microhemorrhages or high myelin content. The accuracy of BVf measurements is also critical because it depends on dosing and characteristics of the contrast agent (33). Nevertheless, we previously found an excellent correlation between lSO_2 and hemoglobin oxygen saturation in the superior sagittal sinus of rats subjected to oxygen challenges (24, 28). If cerebral arterial oxygen content is kept constant, lSO_2 measurements might be considered providing an estimation of brain OEF, with OEF ~ 1–lSO_2, as previously shown (30).

In the TBI-saline group, we found lower lSO_2 measurements, that is, higher brain tissue OEF, by comparison with the sham-operated group. These findings were confirmed by $PbtO_2$ measurements, which were closely related to the product of cerebral blood flow (CBF) and arteriovenous oxygen tension difference (6), and inversely correlated with OEF (34). With no evidence of systemic reasons known to reduce arterial oxygen supply, that is, acute anemia, systemic hypoxia, arterial hypotension, and severe hypocapnia, it is reasonable to consider that the high OEF values reflected reduced venous oxygen saturation after trauma. In simple terms, cerebral ischemia results when the delivery of oxygenated blood is insufficient to meet metabolic demand. Initially, cerebral metabolic rate in oxygen ($CMRO_2$) is maintained despite a reduction in CBF through an increase in the OEF. This situation corresponds to the penumbra in stroke (35), as well as in trauma (36, 37). However, the concept of traumatic penumbra is consistent with high OEF values, that is, more than 50%, and concomitant reduction in CBF. In the present study, we found no evidence of such a reduction in CBF as assessed by MTT and BVf, and the lSO_2 values obtained after trauma would have corresponded to OEF of ~30% vs. ~20% in sham-operated animals (**Fig. 2B**). On the other hand, an increase in $CMRO_2$, potentially unmet by inadequate CBF levels, could also be possible through a TBI-induced excitotoxicity. However, such a change in brain metabolism would be expected to have played only a limited role in mechanically ventilated animals maintained under deep anesthesia and normothermia throughout the experiments. The results in the TBI-saline group would appear to have been due to mechanisms involving the injured tissue and its microvascular environment without any frank ischemia being caused.

Marked disturbances in microcirculatory blood flow have been found early after traumatic contusion due to swollen glial-foot processes compressing underlying capillaries (11) and/or to the formation of thrombi in the cerebral microcirculation (13). Additionally, electron microscopy has shown endothelial edema, vacuolization, and pinocytic vesicles, alongside undisrupted tight junctions following TBI (9, 10, 14). We used the impact-acceleration model that causes early diffuse post-traumatic edema with no disruption to the blood–brain barrier or traumatic contusion (23, 38). The presence of this cellular (cytotoxic) type of edema was reflected by the decreased ADC values and by the ultrastructural analysis. Overall, our study indicates that derangements in the microcirculatory blood flow, in part induced by surrounding brain tissue edema, might have accounted for the differences in brain oxygenation as assessed by lSO_2 and $PbtO_2$ between TBI-saline and sham-operated groups. In addition, the parallel changes in brain oxygenation obtained from PbtO2 and MRI measurements favor $PbtO_2$ measurements after diffuse TBI.

We hypothesized that any manipulation to reduce brain edema and concomitant microvascular collapse would improve brain tissue oxygenation. We previously found rhEPO to be a potent anti-edematous agent effective early and durably in this model of diffuse post-traumatic edema (19). In the two TBI-EPO-treated groups, ADC measurements (first series of experiments) and electron microscopy (third series of experiments) at H2 provided evidence of a reduction in brain edema. Moreover, changes in ADC paralleled those in lSO_2 (first series of experiments) and $PbtO_2$ levels were similarly affected by rhEPO treatment (second series of experiments) to reach values comparable to those found in sham-operated groups. Collectively, these findings support the beneficial effect of administering rhEPO post-TBI in improving brain tissue oxygenation with no concomitant systemic changes in blood oxygen supply, that is, blood pressure, PaO_2, and hemoglobin content. However, the exact mechanism by which rhEPO changes post-traumatic brain tissue oxygenation remains unclear. A straightforward anti-edematous effect as obtained with osmotic agents is unlikely to be the unique mechanism. Indeed, the use of those agents to reduce cellular edema yielded inconsistent effects on brain oxygenation (39–41). The effects of rhEPO are more likely mediated through a combined action on edematous cells surrounding the capillaries and microvasculature. We have previously proposed that inhibition of the mitogen-activated

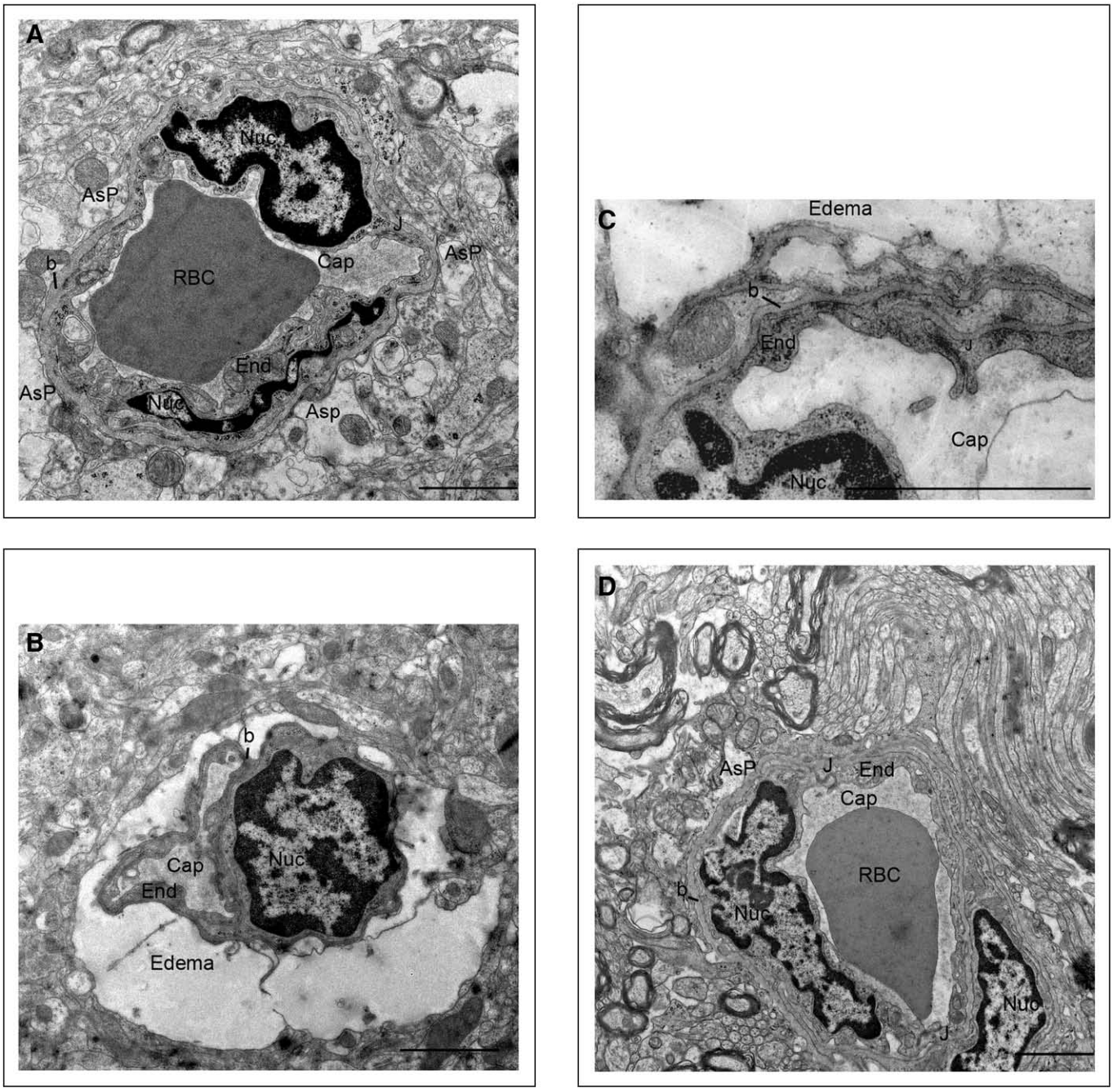


Figure 5. Ultrastructural appearance of the cortical tissue in sham-operated (**A**), traumatic brain injury (TBI)-saline (**B** and **C**), and TBI-erythropoietin (EPO) rats (**D**). **A**, Electron micrograph of normal tissue (sham-operated). A capillary (Cap) is formed by thin endothelial cells (End)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

protein kinase extracellular-regulated kinase (ERK-1/-2) with rhEPO may contribute to preventing the development of post-traumatic brain edema (38). Concordantly, inhibition of ERK-1/-2 was also shown to diminish cell swelling induced by oxidative stress(42) and block manganese-induced increase in aquaporin-4 protein expression (43). In addition, there is some evidence that the binding of EPO to its receptor on endothelial cells leads to phosphorylation of the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway (44) that causes endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and subsequent cerebral vasodilation (22). Whatever the mechanism involved, the resulting effect of rhEPO treatment after TBI appears to allow the rapid redistribution of capillary flow by reopening collapsed capillaries. According to recent modeling of brain oxygen extraction capacity, such a result would be expected to increase tissue efficacy to utilize oxygen (8).

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

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

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the MRI facility of the Grenoble and Julie Delaroche from the Electron Microscopy Facility of Grenoble for their experimental support. Epoietin alpha (Eprex) was kindly provided by Janssen-Cilag Division Ortho Biotech, Issy-les-Moulineaux, France. P904 contrast agent was kindly provided by Guerbet S.A., Roissy, France.

REFERENCES

1. Bratton SL, Chestnut RM, Ghajar J, et al: Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. IX. Cerebral perfusion thresholds. *J Neurotrauma* 2007; 24(Suppl 1):S59–64
2. Chang JJ, Youn TS, Benson D, et al: Physiologic and functional outcome correlates of brain tissue hypoxia in traumatic brain injury. *Crit Care Med* 2009; 37:283–290
3. Oddo M, Levine JM, Mackenzie L, et al: Brain hypoxia is associated with short-term outcome after severe traumatic brain injury independently of intracranial hypertension and low cerebral perfusion pressure. *Neurosurgery* 2011; 69:1037–45; discussion 1045
4. Stiefel MF, Spiotta A, Gracias VH, et al: Reduced mortality rate in patients with severe traumatic brain injury treated with brain tissue oxygen monitoring. *J Neurosurg* 2005; 103:805–811
5. Narotam PK, Morrison JF, Nathoo N: Brain tissue oxygen monitoring in traumatic brain injury and major trauma: outcome analysis of a brain tissue oxygen-directed therapy. *J Neurosurg* 2009; 111:672–682
6. Rosenthal G, Hemphill JC III, Sorani M, et al: Brain tissue oxygen tension is more indicative of oxygen diffusion than oxygen delivery and metabolism in patients with traumatic brain injury. *Crit Care Med* 2008; 36:1917–1924
7. Masamoto K, Tanishita K: Oxygen transport in brain tissue. *J Biomech Eng* 2009; 131:074002
8. Jespersen SN, Østergaard L: The roles of cerebral blood flow, capillary transit time heterogeneity, and oxygen tension in brain oxygenation and metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; 32:264–277
9. Vaz R, Sarmento A, Borges N, et al: Ultrastructural study of brain microvessels in patients with traumatic cerebral contusions. *Acta Neurochir (Wien)* 1997; 139:215–220
10. Rodríguez-Baeza A, Reina-de la Torre F, Poca A, et al: Morphological features in human cortical brain microvessels after head injury: a three-dimensional and immunocytochemical study. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003; 273:583–593
11. Bullock R, Maxwell WL, Graham DI, et al: Glial swelling following human cerebral contusion: an ultrastructural study. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1991; 54:427–434
12. Dietrich WD, Alonso O, Halley M: Early microvascular and neuronal consequences of traumatic brain injury: a light and electron microscopic study in rats. *J Neurotrauma* 1994; 11:289–301
13. Schwarzmaier SM, Kim SW, Trabold R, et al: Temporal profile of thrombogenesis in the cerebral microcirculation after traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* 2010; 27:121–130
14. Menon DK, Coles JP, Gupta AK, et al: Diffusion limited oxygen delivery following head injury. *Crit Care Med* 2004; 32:1384–1390
15. Velly L, Pellegrini L, Guillet B, et al: Erythropoietin 2nd cerebral protection after acute injuries: a double-edged sword? *Pharmacol Ther* 2010; 128:445–459
16. Ponce LL, Navarro JC, Ahmed O, et al: Erythropoietin neuroprotection with traumatic brain injury. *Pathophysiology* 2012 Mar 13. [Epub ahead of print] doi.org/10.1016/j.pathophys.2012.02.005
17. Yatsiv I, Grigoriadis N, Simeonidou C, et al: Erythropoietin is neuroprotective, improves functional recovery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury. *FASEB J* 2005; 19:1701–1703
18. Robertson CS, Garcia R, Gaddam SS, et al: Treatment of mild traumatic brain injury with an erythropoietin - mimetic peptide. *J Neurotrauma* 2012; doi:10.1089/neu.2012.2431
19. Verdonck O, Lahrech H, Francony G, et al: Erythropoietin protects from post-traumatic edema in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27:1369–1376
20. Bouzat P, Francony G, Thomas S, et al: Reduced brain edema and functional deficits after treatment of diffuse traumatic brain injury by carbamylated erythropoietin derivative. *Crit Care Med* 2011; 39:2099–2105
21. Xiong Y, Mahmood A, Qu C, et al: Erythropoietin improves histological and functional outcomes after traumatic brain injury in mice in the absence of the neural erythropoietin receptor. *J Neurotrauma* 2010; 27:205–215
22. Cherian L, Goodman JC, Robertson C: Neuroprotection with erythropoietin administration following controlled cortical impact injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 322:789–794
23. Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, et al: A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg* 1994; 80:291–300
24. Christen T, Lemasson B, Pannetier N, et al: Evaluation of a quantitative blood oxygenation level-dependent (qBOLD) approach to map local blood oxygen saturation. *NMR Biomed* 2011; 24:393–403
25. Barbier EL, Lamalle L, Décorps M: Methodology of brain perfusion imaging. *J Magn Reson Imaging* 2001; 13:496–520
26. Troprès I, Grimault S, Vaeth A, et al: Vessel size imaging. *Magn Reson Med* 2001; 45:397–408
27. Lemasson B, Christen T, Tizon X, et al: Assessment of multiparametric MRI in a human glioma model to monitor cytotoxic and anti-angiogenic drug effects. *NMR Biomed* 2011; 24:473–482
28. Christen T, Zaharchuk G, Pannetier N, et al: Quantitative MR estimates of blood oxygenation based on T2*: a numerical study of the impact of model assumptions. *Magn Reson Med* 2012; 67:1458–1468

29. Spees WM, Yablonskiy DA, Oswood MC, et al: Water proton MR properties of human blood at 1.5 Tesla: magnetic susceptibility, T(1), T(2), T*(2), and non-Lorentzian signal behavior. *Magn Reson Med* 2001; 45:533–542
30. He X, Yablonskiy DA: Quantitative BOLD: mapping of human cerebral deoxygenated blood volume and oxygen extraction fraction: default state. *Magn Reson Med* 2007; 57:115–126
31. An H, Liu Q, Chen Y, et al: Evaluation of MR-derived cerebral oxygen metabolic index in experimental hyperoxic hypercapnia, hypoxia, and ischemia. *Stroke* 2009; 40:2165–2172
32. Christen T, Lemasson B, Pannetier N, et al: Is T2* enough to assess oxygenation? Quantitative blood oxygen level-dependent analysis in brain tumor. *Radiology* 2012; 262:495–502
33. Valable S, Lemasson B, Farion R, et al: Assessment of blood volume, vessel size, and the expression of angiogenic factors in two rat glioma models: a longitudinal in vivo and ex vivo study. *NMR Biomed* 2008; 21:1043–1056
34. Johnston AJ, Steiner LA, Coles JP, et al: Effect of cerebral perfusion pressure augmentation on regional oxygenation and metabolism after head injury. *Crit Care Med* 2005; 33:189–95; discussion 255
35. Shimosegawa E, Hatazawa J, Ibaraki M, et al: Metabolic penumbra of acute brain infarction: a correlation with infarct growth. *Ann Neurol* 2005; 57:495–504
36. Menon DK: Procrustes, the traumatic penumbra, and perfusion pressure targets in closed head injury. *Anesthesiology* 2003; 98:805–807
37. Abate MG, Trivedi M, Fryer TD, et al: Early derangements in oxygen and glucose metabolism following head injury: the ischemic penumbra and pathophysiological heterogeneity. *Neurocrit Care* 2008; 9:319–325
38. Valable S, Francony G, Bouzat P, et al: The impact of erythropoietin on short-term changes in phosphorylation of brain protein kinases in a rat model of traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010; 30:361–369
39. Sakowitz OW, Stover JF, Sarrafzadeh AS, et al: Effects of mannitol bolus administration on intracranial pressure, cerebral extracellular metabolites, and tissue oxygenation in severely head-injured patients. *J Trauma* 2007; 62:292–298
40. Francony G, Fauvage B, Falcon D, et al: Equimolar doses of mannitol and hypertonic saline in the treatment of increased intracranial pressure. *Crit Care Med* 2008; 36:795–800
41. Diringer MN, Scalfani MT, Zazulia AR, et al: Cerebral hemodynamic and metabolic effects of equi-osmolar doses mannitol and 23.4% saline in patients with edema following large ischemic stroke. *Neurocrit Care* 2011; 14:11–17
42. Moriyama M, Jayakumar AR, Tong XY, et al: Role of mitogen-activated protein kinases in the mechanism of oxidant-induced cell swelling in cultured astrocytes. *J Neurosci Res* 2010; 88:2450–2458
43. Rao KV, Jayakumar AR, Reddy PV, et al: Aquaporin-4 in manganese-treated cultured astrocytes. *Glia* 2010; 58:1490–1499
44. Kilic E, Kilic U, Soliz J, et al: Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK-1/-2 and Akt pathways. *FASEB J* 2005; 19:2026–2028
45. Kroppenstedt SN, Thomale UW, Griebenow M, et al: Effects of early and late intravenous norepinephrine infusion on cerebral perfusion, microcirculation, brain-tissue oxygenation, and edema formation in brain-injured rats. *Crit Care Med* 2003; 31:2211–2221
46. Lifshitz J, Sullivan PG, Hovda DA, et al: Mitochondrial damage and dysfunction in traumatic brain injury. *Mitochondrion* 2004; 4: 705–713
47. Gunnarson E, Song Y, Kowalewski JM, et al: Erythropoietin modulation of astrocyte water permeability as a component of neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:1602–1607

d. Résultats

Dans cette première série d'expérience, nous avons donc observé la survenue d'un œdème cérébral associé à une hypoxie tissulaire cérébrale au décours d'un TC diffus, en dehors de tout évènement ischémique macrovasculaire identifié en IRM (BVf et TTM stables). L'hypoxie tissulaire post traumatique semble donc être liée à des troubles microcirculatoires avec troubles de la diffusion en oxygène. Ceci est confirmé par la présence d'un œdème prédominant au niveau des pieds astrocytaires gênant la diffusion de l'O2 du sang aux cellules cérébrales en microscopie électronique. D'autres auteurs ont décrit un trouble de la diffusion en oxygène à la suite d'un TC, responsable d'une inadaptation de l'OEF dans des zones contuses lors d'une épreuve d'hyperventilation chez des patients victimes d'un TC grave (Menon, Coles et al. 2004). Ces troubles microcirculatoires ont ainsi déjà été décrits soit en lien avec des phénomènes de collapsus vasculaires ou de microthrombi (Bullock, Maxwell et al. 1991, Dietrich, Alonso et al. 1994).

L'administration post traumatique de rhEpo démontre son efficacité en termes de diminution de l'œdème astrocytaire et donc d'amélioration des troubles microcirculatoires dans notre étude. Cet effet anti-œdémateux déjà identifié dans la littérature, pourrait impliquer les voies de signalisation ERK1/-2, des effets sur les aquaporines... De par une diminution des troubles microcirculatoires, la rhEpo améliore l'oxygénation cérébrale tissulaire dans notre modèle.

Les résultats prometteurs de la rhEpo en recherche préclinique ont ainsi entrainé son application à l'homme. Actuellement cependant, aucun effet bénéfique n'a été retrouvé lors de grandes études en clinique humaine (Nichol, Little et al. 2014, Robertson, Hannay et al. 2014, Nichol, French et al. 2015, Liepert 2016). Une méta analyse avec quelques essais cliniques rapportent un effet bénéfique en terme de mortalité et de réduction des durées d'hospitalisation (Liu, Wen et al. 2016) ainsi qu'une amélioration fonctionnelle en post TC après des injections répétées (Li, Xiao et al. 2016). Le « consortium operation brain trauma » a publié en 2016 une absence d'efficacité de la rhEpo en termes d'effets histologiques, neurocomportementaux et sur les biomarqueurs dans 3 grands modèles expérimentaux (Bramlett, Dietrich et al. 2016) malgré des résultats précédents encourageants (Oddo 2013, Peng, Xing et al. 2014) y compris avec des injections retardées (Xiong, Mahmood et al. 2010, Meng, Xiong et al. 2011).

e. Conclusion

Nous avons retrouvé que dans notre modèle de TC diffus, l'œdème cérébral post traumatique était localisé au sein des pieds astrocytaires péri vasculaires entrainant ainsi des troubles de la microcirculation et donc de la diffusion en oxygène aux tissus, en dehors de tout trouble macrovasculaire. Ces troubles de la diffusion en oxygène étaient ainsi responsables d'une hypoxie tissulaire post traumatique.

L'administration post traumatique de rhEpo 30 minutes après le TC permettait de diminuer cet œdème cérébral et donc de diminuer l'hypoxie tissulaire post traumatique observée à la fois en IRM et par la mesure de la PtiO2.

2. Etude 2 : Etude de l'administration de mannitol post traumatique sur l'œdème cérébral et l'hypoxie tissulaire post traumatique dans un modèle de TC diffus chez le rat.

a. Justification

Suite aux résultats de la première étude, nous avons voulu observer si l'administration d'une molécule anti œdémateuse de référence permettait de diminuer cet œdème péri vasculaire astrocytaire et donc d'améliorer l'hypoxie cérébrale post traumatique en comparison avec la rhEpo.

Le mannitol est actuellement un traitement de type osmothérapie faisant référence dans le cadre de la prise en charge des patients traumatisés crâniens. Nous avons donc étudié les effets d'une administration de mannitol post traumatique après un TC diffus en suivant le même protocole d'expérimentations.

Dans cette deuxième étude, nous avons testé l'effet du mannitol sur l'œdème cérébral et l'hypoxie cérébrale post traumatique par IRM. L'œdème cérébral et la saturation tissulaire en oxygène ont été mesurés par IRM de diffusion avec mesure du coefficient apparent de diffusion de l'eau (ADC) et de la ISO2 par effet BOLD en IRM avant le TC et à H2 post TC. L'œdème cérébral était étudié également en microscopie électronique à H2 du TC après sacrifice des animaux. L'hypoxie cérébrale était évaluée par la mesure de la pression tissulaire en oxygène lors d'une deuxième série d'expériences.

b. Hypothèses

Nos hypothèses étaient que :

- A la suite du TC diffus survenait un œdème cérébral entrainant une hypoxie tissulaire comme constaté dans l'étude 1
- Le mannitol, traitement antioedémateux de référence, permettait de diminuer cet œdème et ainsi l'hypoxie tissulaire cérébrale
- La caractérisation de l'état micro et macrovasculaire cérébral post TC nous aiderait à comprendre le mécanisme d'action du mannitol tout comme celui de la rhEpo

c. *Aspects méthodologiques spécifiques*

Thérapeutique étudiée

Dans la 2ème série d'expériences, le mannitol 20% était administré en IVL durant 5 minutes à la dose de 1 g/Kg, 30 minutes après le TC chez les rats TC-mannitol ou son horaire présumée chez les rats Sham-mannitol. Les autres groupes recevaient du sérum salé isotonique à volume équivalent (Sham-saline, TC-saline).

Saturation veineuse du sinus longitudinal supérieur

Aux mesures de l'oxygénation tissulaire globale (IRM) et focale (PtiO2) étudiées dans l'étude 1 nous avons associé une mesure locale également de l'oxygénation tissulaire pour conforter nos résultats. Une ponction du sinus veineux sagittal était réalisée en fin de manipulations dans l'étude 2 au travers de la suture lambdoïde, afin de mesurer la SvsO2 avant sacrifice de l'animal.

Mon implication personnelle dans ce travail a consisté en l'encadrement de Clotilde Schilte durant son année de M2R de recherche faite au sein de l'équipe 5 du GIN (encadrement dans ses manipulations, analyse statistiques, aide dans l'écriture de son mémoire et de l'article soumis)

Mannitol Improves Brain Tissue Oxygenation in a Model of Diffuse Traumatic Brain Injury*

Clotilde Schilte, MD[1,2,3]; Pierre Bouzat, MD, PhD[1,2,3]; Anne Millet, MD[2,3,4]; Perrine Boucheix, MD[1,2,3]; Karin Pernet-Gallay, PhD[2,3]; Benjamin Lemasson, PhD[2,3]; Emmanuel L. Barbier, PhD[2,3]; Jean-François Payen, MD, PhD[1,2,3]

Objectives: Based on evidence supporting a potential relation between posttraumatic brain hypoxia and microcirculatory derangements with cell edema, we investigated the effects of the antiedematous agent mannitol on brain tissue oxygenation in a model of diffuse traumatic brain injury.

Design: Experimental study.

Setting: Neurosciences and physiology laboratories.

Subjects: Adult male Wistar rats.

Interventions: Thirty minutes after diffuse traumatic brain injury (impact-acceleration model), rats were IV administered with either a saline solution (traumatic brain injury-saline group) or 20% mannitol (1 g/kg) (traumatic brain injury-mannitol group). Sham-saline and sham-mannitol groups received no insult.

Measurements and Main Results: Two series of experiments were conducted 2 hours after traumatic brain injury (or equivalent) to investigate 1) the effect of mannitol on brain edema and oxygenation, using a multiparametric magnetic resonance–based approach ($n = 10$ rats per group) to measure the apparent diffusion coefficient, tissue oxygen saturation, mean transit time, and blood volume fraction in the cortex and caudoputamen; 2) the effect of mannitol on brain tissue Po_2 and on venous oxygen saturation of the superior sagittal sinus ($n = 5$ rats per group); and 3) the cortical ultrastructural changes after treatment ($n = 1$ per group, taken from the first experiment). Compared with the sham-saline group, the traumatic brain injury-saline group had significantly lower tissue oxygen saturation, brain tissue Po_2, and venous oxygen saturation of the superior sagittal sinus values concomitant with diffuse brain edema. These effects were associated with microcirculatory collapse due to astrocyte swelling. Treatment with mannitol after traumatic brain injury reversed all these effects. In the absence of traumatic brain injury, mannitol had no effect on brain oxygenation. Mean transit time and blood volume fraction were comparable between the four groups of rats.

Conclusion: The development of posttraumatic brain edema can limit the oxygen utilization by brain tissue without evidence of brain ischemia. Our findings indicate that an antiedematous agent such as mannitol can improve brain tissue oxygenation, possibly by limiting astrocyte swelling and restoring capillary perfusion. (*Crit Care Med* 2015; 43:2212–2218)

Key Words: blood oxygenation level dependent; brain edema; brain oxygenation; diffusion-weighted magnetic resonance imaging; magnetic resonance imaging; mannitol; traumatic brain injury

High intracranial pressure (ICP) has been shown to play a major role in the worsening of neurologic outcome after traumatic brain injury (TBI) (1). Thus, most efforts are directed toward controlling the ICP and maintaining optimal cerebral perfusion pressure (2). However, episodes of brain hypoxia, as reflected by low brain tissue Po_2 ($Pbto_2$), are common despite optimization of cerebral perfusion pressure and ICP in brain-injured patients and were found independently associated with poorer outcome (3). The imbalance between oxygen supply to the brain tissue and its utilization is considered the major cause for the development of secondary brain damage after TBI. Generally, brain tissue hypoxia may result from increased brain metabolism, reduction in cerebral

*See also p. 2267.

[1]Pôle Anesthésie Réanimation, Hôpital Michallon, CHU de Grenoble, Grenoble, France.

[2]INSERM, U836, Grenoble, France.

[3]Grenoble Institut des Neurosciences, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France.

[4]Département de Réanimation Pédiatrique et Néonatale, Hôpital Couple Enfant, Grenoble, France.

This work was performed at INSERM U836 and Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

Drs. Schilte, Millet, Boucheix, Pernet-Gallay, Lemasson, and Barbier performed the investigation. Drs. Schilte, Bouzat, Millet, Boucheix, Pernet-Gallay, and Payen analyzed the data. Drs. Schilte, Bouzat, Barbier, and Payen wrote the article. Drs. Bouzat, Barbier, and Payen designed the investigation.

Supported, in part, by the "Fondation Gueules Cassées." The MRI facility IRMaGe is partly funded by the French program "Investissement d'Avenir" run by the French National Research Agency, grant "Infrastructure d'avenir en Biologie Santé" (ANR-11-INBS-0006).

The authors have disclosed that they do not have any potential conflicts of interest.

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

Copyright © 2015 by the Society of Critical Care Medicine and Wolters Kluwer Health, Inc. All Rights Reserved.

DOI: 10.1097/CCM.0000000000001137

Copyright © 2015 by the Society of Critical Care Medicine and Wolters Kluwer Health, Inc. All Rights Reserved.

blood flow, and/or disturbances in the microcirculation (4). After TBI, marked disturbances in microcirculatory blood flow have been found and might be due to swelling of astroglial foot processes and compression of surrounding capillaries (5–7). Despite the absence of frank cerebral ischemia, such a perivascular edema might constitute a barrier to oxygen diffusion with a resulting reduction in oxygen delivery to brain tissue (8). In other words, the development of perivascular swelling with diffuse brain edema after TBI could alter capillary architecture, thus leading to a limitation of oxygen delivery.

In order to investigate the relationship between edema and oxygenation within brain tissue showing no evidence of macrovascular disturbance, we recently developed a multiparametric magnetic resonance–based approach to map brain tissue oxygen saturation (St_{O_2}) (9). In a model of diffuse TBI, we found that posttraumatic administration of recombinant human erythropoietin significantly improved brain oxygenation, as assessed by Pbt_{O_2} and St_{O_2}, and reduced brain edema (10). This may indicate that any manipulation to reduce brain edema and the concomitant microvascular collapse would improve brain tissue oxygenation. However, recombinant human erythropoietin is a multifunctional agent with versatile properties, including effects on endothelial growth and cerebral vasculature (11, 12). These findings prompted us to study the acute effects of a strict antiedematous agent, mannitol, on brain oxygenation in a rat model of posttraumatic diffuse brain edema. Although the effects of mannitol on ICP and cerebral perfusion pressure are well documented (13, 14), little is known with regard to its effects on brain oxygenation, and the few published results are not equivocal (15–18). Here, we hypothesized that mannitol could decrease perivascular edema after diffuse TBI and thereby improve brain oxygenation.

MATERIALS AND METHODS

Two series of experiments were conducted on each of four groups of adult male Wistar rats (350–450 g). In the first series of experiments, we investigated the effect of mannitol on combined measurements of brain edema and brain oxygenation after diffuse TBI. We used diffusion-weighted MRI to assess brain edema both prior to and 2 hours (H2) after TBI, thus each rat (n = 10 per group) acted as its own control. Brain St_{O_2} was subsequently measured using multiparametric MRI measurements at H2 postinjury. Rats were assigned to one of four groups: the TBI-saline group received saline and the TBI-mannitol group mannitol, 30 minutes after the TBI insult. Sham-saline and sham-mannitol rats received no TBI insult. At the end of the experiment (H2), the rats were killed to study ultrastructural changes (n = 1 per group). In the second series of experiments (n = 5 rats per group), Pbt_{O_2} and venous oxygen saturation of the superior sagittal sinus (Sss_{O_2}) were assessed at H2 following the same therapeutic protocol.

Experimental Protocol

The study design received approval from the local Internal Evaluation Committee for Animal Welfare and Rights. Experiments were conducted in accordance with French Government guidelines (licenses 380819 and A3851610008). The study design was based on a previously described protocol (10). Anesthesia was induced and maintained using isoflurane (inspired fraction of 2.0%) during the study period. After tracheal intubation, rats were mechanically ventilated with 70% air–30% oxygen using a rodent ventilator (SAR-830/P, CWE, Ardmore, PA). Catheters were inserted into the femoral artery and vein for mean arterial blood pressure monitoring and the delivery of drugs. Blood gases (Pa_{O_2} and Pa_{CO_2}), oxygen saturation of hemoglobin, arterial pH, and hemoglobin content were measured from arterial blood samples smaller than 0.1 mL (ABL 510, Radiometer, Copenhagen, Denmark). Rectal temperature was kept at 36.5°C ± 0.5°C with heating devices. Criteria for exclusion from the study were values falling outside the range for the following physiologic variables measured at 1 hour (H1) after the reference time (cf. below): mean arterial blood pressure less than 70 mm Hg, Pa_{O_2} less than 100 mm Hg, Pa_{CO_2} less than 30 mm Hg or greater than 45 mm Hg, and hemoglobin content less than 80 g/L. As per the initial description of impact-acceleration model (19), injury was induced by dropping a 500 g mass through a vertical cylinder from a height of 1.5 m onto a metallic disc glued to the central area of the skull vault between the coronal and lambdoid sutures. The moment of impact corresponded to the reference time (H0) for TBI groups or to an equivalent time for the sham-operated groups. Thirty minutes after H0, the rats were IV administered either 1 g/kg of 20% mannitol (5 mL/kg) (Macopharma, Mouvaux, France) (mannitol group) or equivalent volume of an isotonic saline solution (TBI-saline), during a 5-minute continuous infusion. The two sham-operated groups were similarly treated but had not been submitted to TBI.

MRI Measurements

MRI was performed at 4.7 T, in a horizontal bore magnet (Bruker Biospec 47/40 USR AV III, Bruker Biospin, Wissembourg, France). Five adjacent rostrocaudal slices were acquired using 2D diffusion-weighted, spin-echo, single-shot echo-planar imaging (repetition time = 2,500 ms; echo time = 30 ms; field of view = $30 \times 30\,mm^2$; matrix = 64×64; eight averages; voxel size = $468 \times 468 \times 1{,}000\ \mu m^3$). This sequence was applied four times, once without diffusion weighting and three times with diffusion weighting (b = 800 smm^{-1}) in three orthogonal directions, in order to map the apparent diffusion coefficient (ADC). St_{O_2} maps were obtained using a multiparametric quantitative blood oxygenation level–dependent approach, as previously described (9, 20). Hematocrit was fixed to 0.85 × 42%. The 0.85 factor accounts for the Fahraeus-Lindqvist effect, which indeed reduces the hematocrit in small capillaries. Cerebral perfusion was measured using a previously described steady-state approach based on the change in susceptibility after injection of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide (P904, 200 μmol/kg; Guerbet S.A., Aulnay-sous-Bois, France), which allows the determination of blood volume fraction (BVf) and mean transit time (MTT) (21).

For each rat, one region of interest including cortex and caudoputamen and excluding ventricle and corpus callosum was manually drawn on the T2-weighted image. This region

Copyright © 2015 by the Society of Critical Care Medicine and Wolters Kluwer Health, Inc. All Rights Reserved.

was copied onto the ADC, Sto_2, BVf, and MTT images. The ADC changes (ΔADC) were calculated at H2 by comparison with H0: ΔADC = (ADC at H2 – ADC at H0)/ADC at H0.

Ultrastructural Analysis

At the end of this first series of experiments, rats were killed using intracardiac perfusion of paraformaldehyde (n = 1 rat per group). Brains were rapidly excised and cortex and caudoputamen samples of 1 mm² were fixed in 2.5% glutaraldehyde (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4) for 24 hours at room temperature. Samples were postfixed in 1% osmium tetroxide (0.1 M cacodylate, pH 7.2) for 1 hour at 4°C and stained with 1% uranyl acetate (pH 4) in water for 1 hour at 4°C before being dehydrated through graded alcohol concentrations and then embedded in Epoxy Embedding Medium (Fluka, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Cortex brain ultrathin sections (60-nm-thickness) were stained with 5% uranile acetate and 0.4% lead citrate before being observed under a transmission electron microscope at 80 kV (Jeol 1200 EX, JEOL, Tokyo, Japan). The analysis was performed on two cortex and two caudoputamen samples per rat, and 15 images of capillary cross sections were acquired for each sample. Results were expressed as a percentage of normal capillaries (capillaries without any edema) and of capillaries surrounded by edema (more than half of the capillary surface). Status of brain capillaries was assessed blindly for treatment or group allocation. Images were acquired with a digital camera (Veleta, SIS, Olympus, Munster, Germany).

$Pbto_2$ and Sagittal Sinus So_2 Measurements

In the second series of experiments, a $Pbto_2$ probe was stereotactically inserted (–1 mm from bregma, 3 mm from the sagittal suture, and 3 mm depth from the skull) immediately after the insult (or equivalent time) (Oxylite, Oxford Optronics, Oxford, United Kingdom). This insertion site corresponded to the cortical region of interest explored by MRI. The functioning of the $Pbto_2$ probe was tested with a transient increase of the FIO_2. $Pbto_2$ measurements were then collected at H2 under stable Pao_2, $Paco_2$, hemoglobin content, temperature, and mean arterial blood pressure. Thereafter, a puncture of the venous sagittal sinus (22-G needle; 0.1 mL) through the lambdoid suture was performed to measure Sso_2, as described previously (20).

Statistical Analysis

Data were expressed as median (min; max). The nonparametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were performed for continuous variables (GraphPad Prism, GraphPad Software, San Diego, CA). Bonferroni correction was applied for multiple comparisons where appropriate. Statistical significance was declared when p value is less than 0.05.

RESULTS

The four groups of rats displayed no differences in physiologic variables during the two series of experiments (**Tables 1** and **2**). The ADC values of the region of interest were significantly reduced at H2 in the TBI-saline group compared with the other three groups: ΔADC = –11% (–7%; –17%) versus 0% (–10%; 17%) (TBI-mannitol), 2% (–8%; 24%) (sham-saline), and 3% (–19%; 34%) (sham-mannitol) ($p < 0.05$ vs TBI-saline) (**Fig. 1*A***). The Sto_2 values obtained at H2 were also significantly lower in the TBI-saline group compared with the TBI-mannitol group and sham-saline group: 78% (55%; 83%) versus 82% (71%; 87%) and 83% (74%; 92%) ($p < 0.05$ vs TBI-saline) (**Fig. 1*B***). The Sto_2 values showed no difference, however, between the TBI-saline group and sham-mannitol group (82% [64%; 88%]). All four groups displayed similar MTT values in the region of interest: 0.9 second (0.6 s; 1.8 s), 1.0 second (0.7 s; 1.8 s), 1.4 seconds (0.9 s; 2.0 s), and 1 second (0.7 s; 1.7 s) in the sham-saline, TBI-saline, TBI-mannitol, and sham-mannitol groups, respectively (**Fig. 2*A***). Similarly, BVf values were no different between the four groups: 4.9% (3.2%; 8.8%), 5.3% (3.9%; 6.8%), 5.4% (3.4%; 6.5%), and 6.9% (3.4%; 9.2%) of brain tissue, respectively (**Fig. 2*B***).

TABLE 1. Physiologic Data From the Four Groups of Rats in the First Series of Experiments (n = 10 Rats per Group): Sham-Saline, Traumatic Brain Injury-Saline, Traumatic Brain Injury-Mannitol, and Sham-Mannitol

Variable	Sham-Saline	TBI-Saline	TBI-Mannitol	Sham-Mannitol
Weight (g)	408 (300; 430)	390 (350; 490)	430 (410; 480)	410 (350; 490)
Pao_2 (mm Hg)	109 (90; 115)	100 (90; 125)	100 (70; 150)	100 (77; 146)
$Paco_2$ (mm Hg)	34 (25; 41)	37 (35; 45)	33 (25; 45)	38 (25; 43)
Arterial pH	7.31 (7.30; 7.43)	7.33 (7.29; 7.46)	7.30 (7.22; 7.42)	7.34 (7.30; 7.41)
Hemoglobin (g/dL)	11.7 (10; 13.3)	12.4 (10.9; 12.8)	11.2 (10; 14.3)	12.9 (11.3; 14.2)
Mean arterial blood pressure (mm Hg)	66.5 (65; 70)	65 (65; 75)	65 (61; 77)	68 (60; 80)
Temperature	37 (36.2; 37.8)	36.5 (35; 37)	36.9 (36; 37.8)	37.0 (35.7; 37.8)

TBI = traumatic brain injury.
Data were collected 2 hr after the TBI impact (or equivalent time in sham-operated rats).
Data are expressed as median (minimum; maximum).

Copyright © 2015 by the Society of Critical Care Medicine and Wolters Kluwer Health, Inc. All Rights Reserved.

TABLE 2. Physiologic Data From the Four Groups of Rats in the Second Series of Experiments ($n = 5$ Rats per Group): Sham-Saline, Traumatic Brain Injury-Saline, Traumatic Brain Injury-Mannitol, and Sham-Mannitol

Variable	Sham-Saline	TBI-Saline	TBI-Mannitol	Sham-Mannitol
Weight (g)	420 (380; 480)	425 (360; 460)	436 (410; 450)	450 (396; 480)
Pao_2 (mm Hg)	134 (103; 150)	130 (100; 160)	134 (110; 145)	126 (119; 141)
$Paco_2$ (mm Hg)	36 (25; 40)	29 (24; 39)	36 (25; 45)	42 (30; 47)
Arterial pH	7.31 (7.26; 7.35)	7.35 (7.31; 7.48)	7.31 (7.16; 7.35)	7.27 (7.18; 7.35)
Hemoglobin (g/dL)	10.8 (10.0; 11.9)	12.0 (10.0; 13.7)	12.1 (10; 13.6)	12.8 (10.5; 13.8)
Mean arterial blood pressure (mm Hg)	72 (64; 80)	75 (65; 80)	75 (65; 75)	73 (62; 75)
Temperature	36.7 (36.4; 37.5)	36.9 (36.5; 37)	36.5 (36; 37.2)	37.4 (36.6; 38.2)

TBI = traumatic brain injury.
Data were collected 2 hr after the TBI impact (or equivalent time in sham-operated rats).
Data are expressed as median (minimum; maximum).

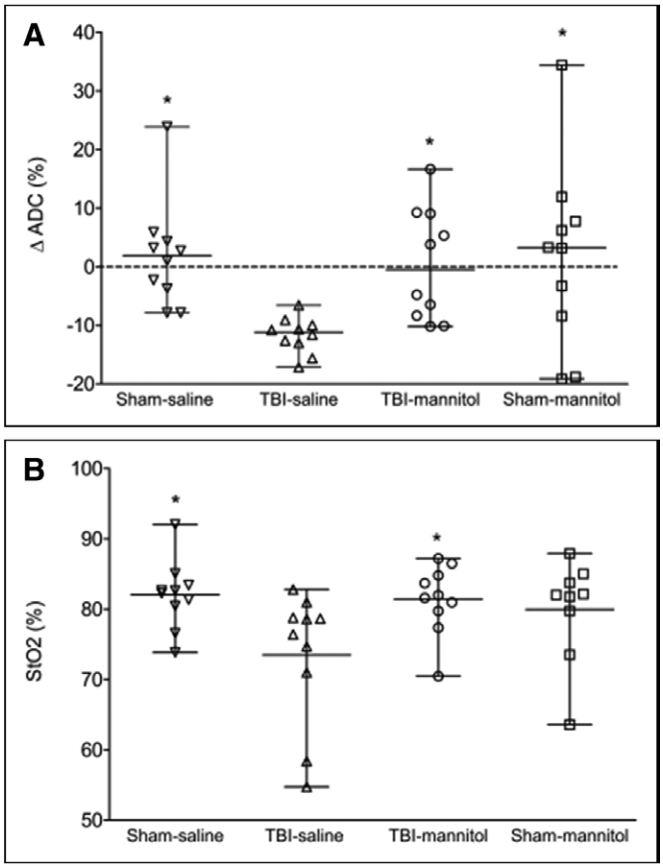


Figure 1. A, Changes (in %) in averaged apparent diffusion coefficient (ΔADC) values of water in the gray matter (included neocortex and caudoputamen) between baseline and 2 hr (H2) after traumatic brain injury (TBI) in four groups of rats ($n = 10$ per group): sham-saline, TBI-saline, TBI-mannitol, and sham-mannitol. **B**, Averaged tissue oxygen saturation (Sto_2) values in the four groups of rats at H2. Data are expressed as mean ± SD. $^*p < 0.05$ versus TBI-saline.

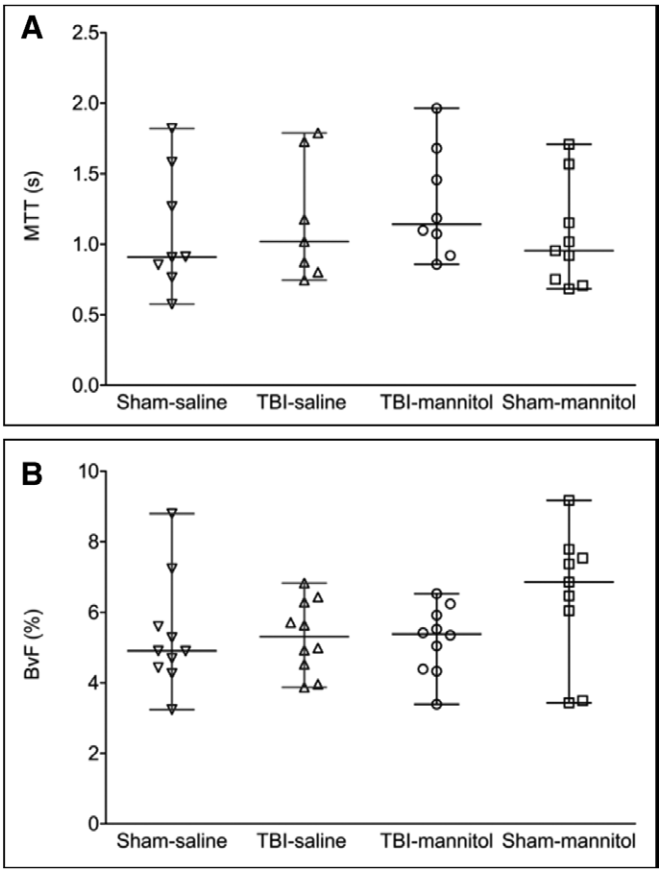


Figure 2. Mean transit time (MTT, in s) (**A**) and cerebral blood volume (BVf, in %) (**B**) in the gray matter (included neocortex and caudoputamen) obtained 2 hr after traumatic brain injury (TBI) (or equivalent time) in the four groups of rats ($n = 10$ per group): sham-saline, TBI-saline, TBI-mannitol, and sham-mannitol. Data are expressed as mean ± SD.

In the second series of experiments, the TBI-saline group displayed lower values for $Pbto_2$ at H2 (21 mm Hg [18 mm Hg; 24 mm Hg]) compared with those found in the TBI-mannitol group (42 mm Hg [34 mm Hg; 50 mm Hg]) and sham-saline group (53 mm Hg [40 mm Hg; 57 mm Hg]) ($p < 0.05$ vs TBI-saline) (**Fig. 3*A***). Sham-mannitol group had $Pbto_2$ 40 mm Hg (34 mm Hg; 44 mm Hg). The TBI-saline group also displayed

Copyright © 2015 by the Society of Critical Care Medicine and Wolters Kluwer Health, Inc. All Rights Reserved.

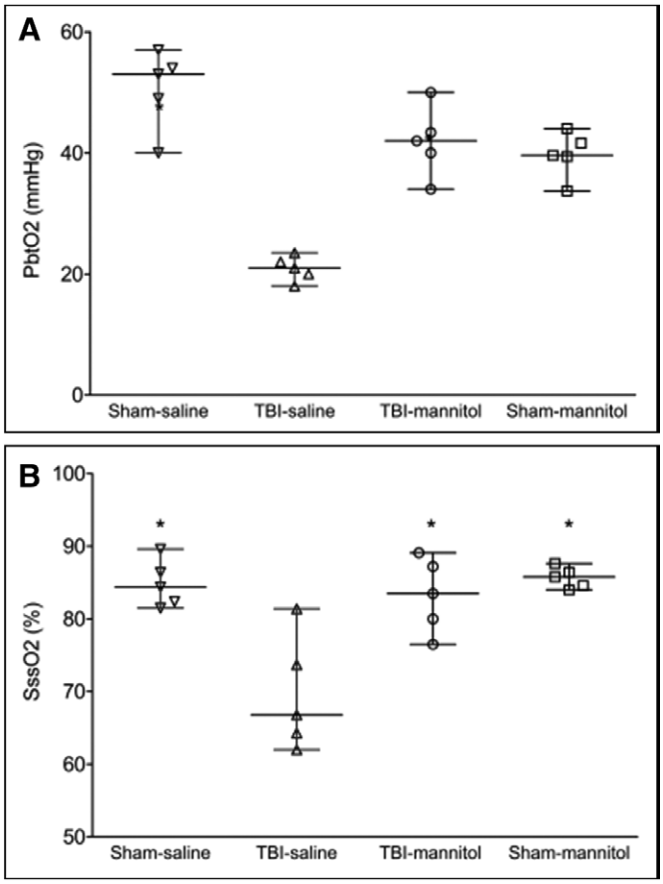


Figure 3. Values of brain tissue oxygenation ($Pbto_2$) (**A**) and venous oxygen saturation of the superior sagittal sinus ($Ssso_2$) (**B**) obtained 2 hr after traumatic brain injury (TBI) (or equivalent time) in the four groups of rats ($n = 5$ per group): sham-saline, TBI-saline, TBI-mannitol, and sham-mannitol. *$p < 0.05$ versus TBI-saline. Data are expressed as mean ± SD.

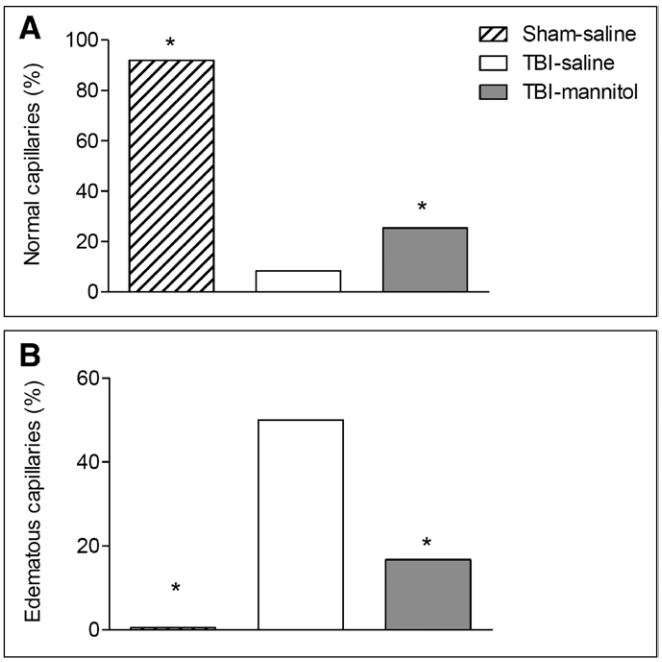


Figure 4. Percent of normal capillaries after traumatic brain injury (TBI) (or equivalent time) (**A**) and percent of capillaries covered by edema on more than half of the surface (**B**) in three rats: sham-saline, TBI-saline, and TBI-mannitol. *$p < 0.05$ versus TBI-saline.

lower values for $Ssso_2$ compared with the other three groups: 67% (62%; 81%) versus 84% (77%; 89%) (TBI-mannitol), 84% (82%; 90%) (sham-saline), and 86% (84%; 88%) (sham-mannitol) ($p < 0.05$ vs TBI-saline group) (**Fig. 3*B***).

We carried out ultrastructural analysis on three groups (one rat per group) only: sham-saline, TBI-saline, and TBI-mannitol. The morphology of brain capillaries showed that only 8% (12 of 151) of capillaries appeared normal in the TBI-saline group, with 50% (76 of 151) being surrounded by edema covering more than half of the capillary surface (**Fig. 4**). This edema was located in the foot processes and cell bodies of astrocytes (**Fig. 5**). Treatment by mannitol reversed these ultrastructural changes induced by TBI: 25% of brain capillaries (29 of 114) appeared normal and 17% of capillaries (19 of 114) had edema covering more than half of the capillary surface (Fig. 4). It should be noted that there were no changes in endothelial cells, tight junctions, or basal lamina following the insult compared with sham-operated rats.

DISCUSSION

In a rodent model of diffuse TBI, we have shown that the antiedematous effect of mannitol is associated with improved brain oxygenation. Our data obtained from various techniques consistently indicated that such a manipulation to reduce perivascular swelling and the concomitant microvascular collapse would improve brain tissue oxygenation, whereas the macrocirculation remained unaffected. These findings are in line with our previous results obtained with recombinant human erythropoietin and underline the detrimental role that microcirculation disturbances have in the posttraumatic development of limited oxygen delivery to brain tissue.

In agreement with our previous study (10), the TBI-saline group displayed lower values for Sto_2 and $Pbto_2$ compared with the sham-saline group. $Pbto_2$ reflects both cerebral blood flow and arteriovenous oxygen tension difference (22). With no evidence of frank brain ischemia and with no reduction in arterial oxygen content, for example, acute anemia, systemic hypoxia, arterial hypotension, $Pbto_2$ results can be interpreted as the increase in the oxygen extraction fraction in the brain tissue of the TBI-saline group. In support of this interpretation was the reduced $Ssso_2$ found in this group. Among the mechanisms to explain this elevation of oxygen extraction fraction after trauma, microcirculatory dysfunction appears to play a key role. Indeed, previous ultrastructural analyses of brain microvessels have found that pericontusional ischemia after TBI is related to the compression of microvessels by swollen glial-foot processes and/or their obstruction by microthrombosis (5, 23, 24). Brain hypoxia might therefore develop in the presence of such barriers to oxygen diffusion (8). In our model of impact-acceleration, there was no evidence of macrovascular alterations, cerebral hematoma, or disrupted tight junctions. These findings were consistent with previous studies showing that blood-brain barrier was not disrupted in the impact-acceleration model of diffuse TBI. Conversely, brain

Copyright © 2015 by the Society of Critical Care Medicine and Wolters Kluwer Health, Inc. All Rights Reserved.

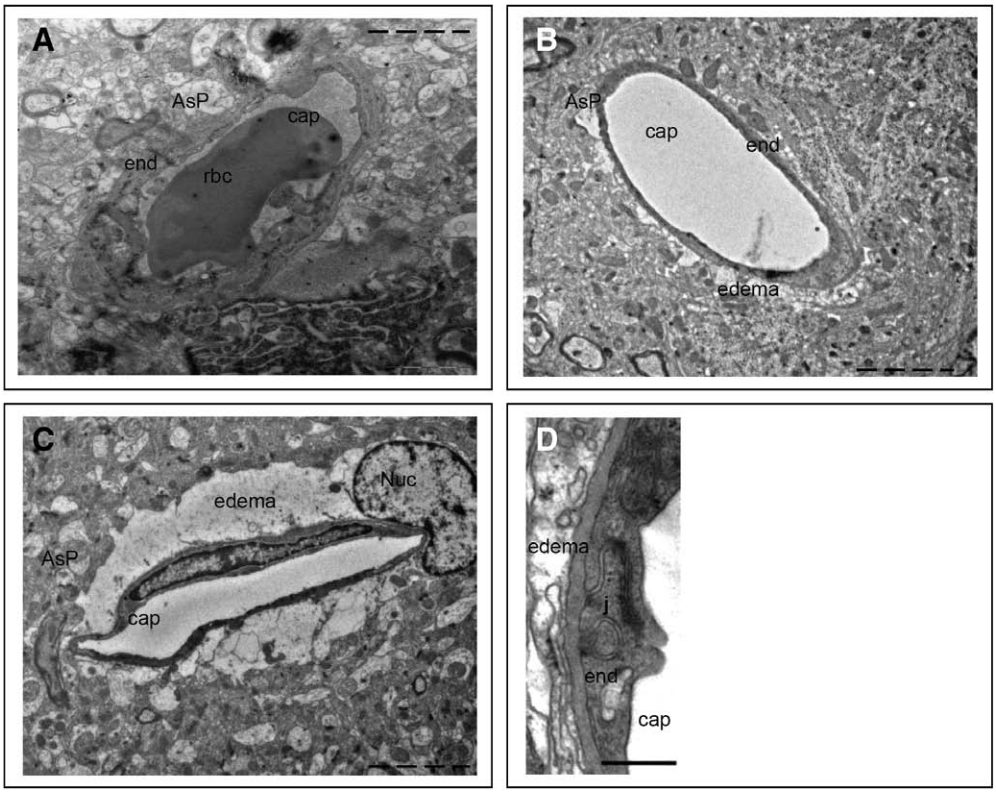


Figure 5. Ultrastructural appearance of the cortical tissue in sham-saline (**A**), TBI-mannitol (**B**), and TBI-saline (**C** and **D**) rats. A, Electron micrograph of normal tissue. A capillary (cap) is formed by thin endothelial cells (end) with a nucleus (Nuc) and contains an RBC (rbc). Basal lamina and astrocytic processes (AsP) surround the capillary. B, Electron micrograph of injured tissue after treatment by mannitol (TBI-mannitol). Basal lamina and tight junctions (j) are intact and the capillary lumen is the same as in the control. C and D, Electron micrograph of injured tissue (TBI-saline). A capillary with a collapsed lumen due to astrocytic edema. Basal lamina and tight junctions (j) are intact, and the endothelium is not swollen. Scale bar (at the bottom of each image) is 2 μm.

cellular edema was developed in glial-foot processes that possibly disturbed the microcirculation and reduced brain oxygenation, as reflected by the decreased Sto_2, $Pbto_2$, and $Ssso_2$ values in the TBI-saline group. Collectively, these findings confirm the notion that brain edema localized to the microcirculation may play a role in the limitation of oxygen delivery to brain tissue. Surprisingly, mannitol resulted in a large variability of ADC in the sham group. These findings might be related to side effects of mannitol in the normal brain. However, the large variability of ADC in this group hindered the interpretation of this result.

In line with our previous study using recombinant human erythropoietin (10), we confirmed that any manipulation to reduce brain edema would in turn improve brain tissue oxygenation. Mannitol expectedly reduced the development of brain edema after diffuse TBI. Interestingly, we found no interstitial perivascular edema in our study, confirming the absence of blood-brain barrier leakage after mannitol (25). Mannitol is a well-known agent used to reduce intracranial hypertension due to brain edema (13, 14). International guidelines recommend the dose of 1 g/kg as effective in the treatment of raised ICP (26). However, data concerning the impact of mannitol on brain oxygenation after brain injury have been inconclusive. Oxygen saturation measurements in the jugular vein were found to be improved (27, 28) or unchanged (29, 30) following mannitol infusion in patients with TBI. More recent studies found negligible effects of mannitol on $Pbto_2$ in brain-injured patients with raised ICP (15–18). The intensity of brain edema, as indirectly reflected by $Pbto_2$ measurements, may explain the discrepancy with our results. Indeed, it should be kept in mind that none of the rats in the TBI-saline group showed evidence of brain hypoxia, as defined by $Pbto_2$ lower than 15 mm Hg and/or $Ssso_2$ lower than 55% (4, 31). Therefore, in the case of severe edema with raised ICP, the possible benefits of mannitol on brain oxygenation may be outweighed by more visible effects on ICP. Mannitol infusion has, however, been shown, using transcranial Doppler, to improve brain circulation in patients with TBI (18). Such an effect might be related to an improvement on blood rheology with mannitol (32, 33). Another mechanism to explain our results could be the decrease in blood viscosity during mannitol infusion. This change in blood rheology might result in increased oxygen delivery to the brain tissue and then in brain oxygenation. We might have underestimated the changes in hematocrit value during mannitol infusion. However, Sto_2 calculation was performed 2 hours after the trauma, thus 1.5 hours after the end of infusion. Should an effect on hematocrit possible during the mannitol infusion (hemodilution), it was no longer effective 2 hours later. Furthermore, the effects on Sto_2 paralleled those on $Ssso_2$ and $Pbto_2$ that were not influenced by hematocrit.

Our study had several limitations. First, brain edema and brain oxygenation were assessed 2 hours after mannitol treatment. Whether the findings are similar with a different timing remains to be determined. However, the duration of effects after mannitol infusion is generally considered to be 2–4 hours (18, 34). No assessment of neurologic outcome using behavioral test was done days after the insult. Therefore, whether the improvement of brain oxygenation after mannitol infusion might result in more favorable neurologic outcome is unknown. Second, our results have been found in the impact-acceleration model and mannitol could have different actions in other TBI models. Our findings deserve validation in several TBI models to generalize our findings. Third, for general anesthesia, we used isoflurane that is known to increase cerebral

Copyright © 2015 by the Society of Critical Care Medicine and Wolters Kluwer Health, Inc. All Rights Reserved.

blood flow in a dose-dependent manner irrespective of brain metabolism. This may also explain the relatively high values for Sto_2, $Pbto_2$, and $Ssso_2$ in the four groups of rats. However, the fraction of inspired isoflurane was similar between the four groups, meaning that this effect was uniform among all groups of rats. Finally, we did not compare the effects of hypertonic saline versus mannitol solution. The present study aimed at exploring the pathophysiologic effect of osmotherapy after posttraumatic brain edema. Whether differences might be seen between osmotic agents would deserve further studies.

In conclusion, in our model of diffuse TBI, we found that brain edema was associated with reduced Sto_2, $Pbto_2$, and $Ssso_2$ values at 2 hours posttrauma. Posttraumatic administration of mannitol was found to improve brain oxygenation while reducing brain edema. The mechanism underlying the improvement in brain oxygenation could be related to the decrease in cellular edema of astrocytes surrounding brain capillaries.

REFERENCES

1. Badri S, Chen J, Barber J, et al: Mortality and long-term functional outcome associated with intracranial pressure after traumatic brain injury. *Intensive Care Med* 2012; 38:1800–1809
2. Brain Trauma Foundation, American Association of Neurological Surgeons, Congress of Neurological Surgeons, et al: Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. VIII. Intracranial pressure thresholds. *J Neurotrauma* 2007; 24(Suppl 1):S55–S58
3. Chang JJ, Youn TS, Benson D, et al: Physiologic and functional outcome correlates of brain tissue hypoxia in traumatic brain injury. *Crit Care Med* 2009; 37:283–290
4. Oddo M, Villa F, Citerio G: Brain multimodality monitoring: An update. *Curr Opin Crit Care* 2012; 18:111–118
5. Bullock R, Maxwell WL, Graham DI, et al: Glial swelling following human cerebral contusion: An ultrastructural study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991; 54:427–434
6. Vaz R, Sarmento A, Borges N, et al: Ultrastructural study of brain microvessels in patients with traumatic cerebral contusions. *Acta Neurochir (Wien)* 1997; 139:215–220
7. Rodríguez-Baeza A, Reina-de la Torre F, Poca A, et al: Morphological features in human cortical brain microvessels after head injury: A three-dimensional and immunocytochemical study. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003; 273:583–593
8. Menon DK, Coles JP, Gupta AK, et al: Diffusion limited oxygen delivery following head injury. *Crit Care Med* 2004; 32:1384–1390
9. Christen T, Bouzat P, Pannetier N, et al: Tissue oxygen saturation mapping with magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014; 34:1550–1557
10. Bouzat P, Millet A, Boue Y, et al: Changes in brain tissue oxygenation after treatment of diffuse traumatic brain injury by erythropoietin. *Crit Care Med* 2013; 41:1316–1324
11. Velly L, Pellegrini L, Guillet B, et al: Erythropoietin 2nd cerebral protection after acute injuries: A double-edged sword? *Pharmacol Ther* 2010; 128:445–459
12. Ponce LL, Navarro JC, Ahmed O, et al: Erythropoietin neuroprotection with traumatic brain injury. *Pathophysiology* 2013; 20:31–38
13. Rozet I, Tontisirin N, Muangman S, et al: Effect of equiosmolar solutions of mannitol versus hypertonic saline on intraoperative brain relaxation and electrolyte balance. *Anesthesiology* 2007; 107:697–704
14. Wang LC, Papangelou A, Lin C, et al: Comparison of equivolume, equiosmolar solutions of mannitol and hypertonic saline with or without furosemide on brain water content in normal rats. *Anesthesiology* 2013; 118:903–913
15. Sakowitz OW, Stover JF, Sarrafzadeh AS, et al: Effects of mannitol bolus administration on intracranial pressure, cerebral extracellular metabolites, and tissue oxygenation in severely head-injured patients. *J Trauma* 2007; 62:292–298
16. Oddo M, Levine JM, Frangos S, et al: Effect of mannitol and hypertonic saline on cerebral oxygenation in patients with severe traumatic brain injury and refractory intracranial hypertension. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009; 80:916–920
17. Helbok R, Kurtz P, Schmidt JM, et al: Effect of mannitol on brain metabolism and tissue oxygenation in severe haemorrhagic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011; 82:378–383
18. Francony G, Fauvage B, Falcon D, et al: Equimolar doses of mannitol and hypertonic saline in the treatment of increased intracranial pressure. *Crit Care Med* 2008; 36:795–800
19. Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, et al: A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg* 1994; 80:291–300
20. Christen T, Lemasson B, Pannetier N, et al: Evaluation of a quantitative blood oxygenation level-dependent (qBOLD) approach to map local blood oxygen saturation. *NMR Biomed* 2011; 24:393–403
21. Troprès I, Grimault S, Vaeth A, et al: Vessel size imaging. *Magn Reson Med* 2001; 45:397–408
22. Rosenthal G, Hemphill JC III, Sorani M, et al: Brain tissue oxygen tension is more indicative of oxygen diffusion than oxygen delivery and metabolism in patients with traumatic brain injury. *Crit Care Med* 2008; 36:1917–1924
23. Dietrich WD, Alonso O, Halley M: Early microvascular and neuronal consequences of traumatic brain injury: A light and electron microscopic study in rats. *J Neurotrauma* 1994; 11:289–301
24. Schwarzmaier SM, Kim SW, Trabold R, et al: Temporal profile of thrombogenesis in the cerebral microcirculation after traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* 2010; 27:121–130
25. Chen KB, Wei VC, Yen LF, et al: Intravenous mannitol does not increase blood-brain barrier permeability to inert dyes in the adult rat forebrain. *Neuroreport* 2013; 24:303–307
26. Brain Trauma Foundation, American Association of Neurological Surgeons, Congress of Neurological Surgeons, et al: Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. II. Hyperosmolar therapy. *J Neurotrauma* 2007; 24(Suppl 1):S14–S20
27. Fortune JB, Feustel PJ, Graca L, et al: Effect of hyperventilation, mannitol, and ventriculostomy drainage on cerebral blood flow after head injury. *J Trauma* 1995; 39:1091–1097; discussion 1097–1099
28. Cruz J, Miner ME, Allen SJ, et al: Continuous monitoring of cerebral oxygenation in acute brain injury: Injection of mannitol during hyperventilation. *J Neurosurg* 1990; 73:725–730
29. Kiening KL, Härtl R, Unterberg AW, et al: Brain tissue pO2-monitoring in comatose patients: Implications for therapy. *Neurol Res* 1997; 19:233–240
30. Unterberg AW, Kiening KL, Härtl R, et al: Multimodal monitoring in patients with head injury: Evaluation of the effects of treatment on cerebral oxygenation. *J Trauma* 1997; 42:S32–S37
31. Bouzat P, Sala N, Payen JF, et al: Beyond intracranial pressure: Optimization of cerebral blood flow, oxygen, and substrate delivery after traumatic brain injury. *Ann Intensive Care* 2013; 3:23
32. Muizelaar JP, Wei EP, Kontos HA, et al: Mannitol causes compensatory cerebral vasoconstriction and vasodilation in response to blood viscosity changes. *J Neurosurg* 1983; 59:822–828
33. Burke AM, Quest DO, Chien S, et al: The effects of mannitol on blood viscosity. *J Neurosurg* 1981; 55:550–553
34. Cottenceau V, Masson F, Mahamid E, et al: Comparison of effects of equiosmolar doses of mannitol and hypertonic saline on cerebral blood flow and metabolism in traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2011; 28:2003–2012

Copyright © 2015 by the Society of Critical Care Medicine and Wolters Kluwer Health, Inc. All Rights Reserved.

d. Résultats

Dans cette deuxième série d'expériences, nous avons retrouvé que l'administration d'un agent osmotique pur de référence, le mannitol, améliorait l'oxygénation cérébrale post traumatique par la diminution de l'œdème astrocytaire péri vasculaire comme la rhEpo. Cet effet était observé en dehors de toute ischémie cérébrale, de toute anémie ou de troubles de contrôle des ACSOS. L'administration de mannitol était également responsable d'une large variation de l'ADC dans le groupe Sham. Ces variations sont probablement en rapport avec une aggravation initiale de l'œdème vasogénique, hypothèses rapportées par quelques études cliniques (Kaufmann and Cardoso 1992). Notre étude n'est pas en accord avec certains résultats rapportés dans la littérature (Unterberg, Kiening et al. 1997, Sakowitz, Stover et al. 2007, Francony, Fauvage et al. 2008).

Les effets bénéfiques en terme de rhéologie sanguine, d'amélioration de l'hémodynamique cérébrale et de baisse de la viscosité sanguine du mannitol sont à prendre en compte dans les effets bénéfiques sur l'hypertension intra crânienne et l'hypoxie tissulaire post traumatique (Muizelaar, Marmarou et al. 1989).

Ces effets ont été souvent comparés à ceux du sérum salé hypertonique (SSH) (Siren, Fasshauer et al. 2009, Sakellaridis, Pavlou et al. 2011). Une méta analyse a rapporté l'absence de supériorité de l'un par rapport à l'autre même si le SSH conduit à l'utilisation de moins de thérapies jouant sur l'HTIC et semble réduire les durées de séjour en ICU (Vialet, Albanese et al. 2003, Battison, Andrews et al. 2005, Benardete 2012, Ropper 2012, Wakai, McCabe et al. 2013, Li, Chen et al. 2015, Burgess, Abu-Laban et al. 2016). Cependant, peu d'études démontrent un effet d'amélioration de la survie ou du devenir neurologique proche (Gantner, Moore et al. 2014). Jagannatha et al. ont montré un effet osmotique supérieur du mannitol en terme de réduction de la PIC du fait d'un effet insuffisant du SSH en lien avec le syndrome de perte de sel observé en post TC après administration de SSH sur une durée de 5j (Jagannatha, Kamath et al. 2016). L'étude de Cottenceau et al. en 2011 ne retrouve pas d'effet du mannitol ou du SSH sur la CMRO2 (Cottenceau, Masson et al. 2011). Oddo et al. en 2009 ont retrouvé une amélioration de la PtiO2 après SSH comme seconde ligne de traitement après mannitol, par un effet anti œdémateux plus marqué (Oddo, Levine et al. 2009)

e. Conclusion

Ces résultats confortent les résultats de l'étude 1, où des troubles microcirculatoires, en lien avec un œdème des pieds astrocytaires péricapillaire, sont responsables d'une diminution de la diffusion en O2 aux tissus dans notre modèle sans troubles macrocirculatoires. Ces troubles sont responsables d'une hypoxie tissulaire.

L'administration de mannitol 30 minutes après un TC diffus à la dose de 1 g/Kg démontre un effet bénéfique sur l'œdème post traumatique observé au niveau des pieds astrocytaires et sur le collapsus vasculaire. Cet effet aboutit donc à une diminution de l'hypoxie cérébrale post traumatique selon une évaluation mutlimodale.

3. Etude 3 : Effet de la rhEpo et de la CEpo sur la dysfonction mitochondriale post traumatique dans un modèle de TC diffus.

a. Justification

Après avoir défini la localisation de l'œdème cérébral dans notre modèle et l'effet bénéfique sur l'hypoxie tissulaire cérébrale post TC de la rhEpo et du mannitol, nous avons voulu étudier les anomalies mitochondriales post traumatiques dans notre modèle. Pour rappel, ces anomalies sont morphologiques et fonctionnelles (apoptose mitochondriale et défaillance de la chaine respiratoire).

Nous nous sommes premièrement intéressés au volet apoptose mitochondriale avec analyse du mPTP. En effet, après un TC, une dysfonction mitochondriale fonctionnelle survient avec ouverture précoce d'un pore de perméabilité mitochondriale, le mPTP, entrainant une apoptose cellulaire responsable en partie du mauvais pronostic neurologique des patients.

Un rôle anti apoptotique de la rhEpo a précédemment été décrit dans des études antérieures avec un effet bénéfique sur l'apoptose mitochondriale dans des modèles d'ischémie myocardique via une régulation de l'ouverture du mPTP. L'implication de voies de signalisation similaires dans l'effet antioedémateux de la rhEpo dans notre modèle dans une étude précédente, nous a amené à étudier les effets de la rhEpo et de la CEpo (dérivé sans fonction hématopoiétique) sur cette dysfonction mitochondriale pro apoptotique post traumatique.

Nous avons voulu évaluer si la rhEpo ou la CEpo permettaient de retarder l'ouverture de ce pore. Nous avons a) mesuré l'œdème cérébral en IRM avec mesure du coefficient apparent de diffusion de l'eau b) testé l'ouverture du pore de perméabilité mitochondrial en mesurant sa capacité de rétention calcique ex vivo après sacrifice des animaux, c) analysé l'apoptose avec étude immunohistochimique en caspase 3 de coupes de cerveaux de rats et la morphologie mitochondriale en microscopie électronique et enfin d) mesuré le calcium intra mitochondrial.

b. Hypothèses

Nos hypothèses étaient que :

- A la suite du TC diffus survient une dysfonction mitochondriale avec ouverture précoce du mPTP
- Cette ouverture du mPTP est responsable d'une apoptose cellulaire
- La rhEpo et la CEpo permettent de retarder l'ouverture du pore, diminuant ainsi l'apoptose cellulaire cérébrale post traumatique.
- La mesure du Ca intra mitochondriale nous aiderait à avancer dans la compréhension des mécanismes d'action de la rhEpo/CEpo de même que l'ajout de ciclosporine A in vitro.

c. Aspects méthodologiques spécifiques

Thérapeutique étudiée

Dans la 3ème étude, la rhEpo ou la CEpo étaient injectées en IV 30 min après le TC à la dose de 5000 UI/Kg ou 50µg/Kg respectivement chez les rats TC-rhEpo et TC-CEpo. Dans les groupes TC-saline et Sham, un délai de 30 min a été respecté avant l'injection de NaCl 0,9% après la fin du TC ou de préparation de l'animal respectivement.

Extraction mitochondriale et étude du mPTP

Cette série d'expériences a été réalisée en collaboration avec le Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée INSERMU1055 grâce à l'aide du Dr Cécile Batandier. L'extraction mitochondriale était réalisée selon une technique d'ultracentrifugation. L'évaluation de la concentration de la suspension mitochondriale était obtenue par le dosage quantitatif des protéines présentes dans la suspension selon la technique de Bradford (Kruger and Hammond 1988).

La capacité de rétention calcique (CRC) représente la quantité de calcium nécessaire pour provoquer l'ouverture du mPTP. Cette mesure permet d'obtenir la réponse du mPTP à son inducteur le plus puissant : le calcium. En pratique, le calcium est ajouté à la suspension mitochondriale à dose et temps fixes. Les mitochondries absorbent le calcium du milieu jusqu'à ce que leur capacité de rétention calcique soit atteinte c'est à dire jusqu'à obtenir l'ouverture du pore. Le nombre d'ajouts de calcium nécessaires (ou pics) pour déclencher la transition de

perméabilité mitochondriale permet d'obtenir la CRC. La concentration calcique extra-mitochondriale est ensuite suivie grâce à une sonde qui devient intensément fluorescente en présence de calcium, le Calcium-Green, qui ne s'accumule pas dans les membranes et ne diffuse pas au travers d'elles et dont la fluorescence est accrue par la présence de calcium. La quantité de Ca2+ nécessaire pour induire l'ouverture du mPTP dans les mitochondries isolées au cours de l'étude est nettement supérieure a la quantité de Ca2+ existante dans les conditions physiologiques voire physiopathologiques. Cette analyse reflète donc plutôt un test des capacités maximales du pore qu'un état superposable à celui observé in vivo, en raison de la disponibilité large de substrats et de cet excès de Ca in vitro.

Pour chaque échantillon de mitochondries, quatre conditions expérimentales ont été réalisées avec différents produits intervenants au niveau de la chaine respiratoire (Figure 18) : ajout d'un substrat du complexe II (Succinate) ou d'un substrat du complexe I (Glutamate Malate) puis ajout de Ciclosporine (inhibiteur de référence du mPTP) au Succinate puis au Glutamate Malate

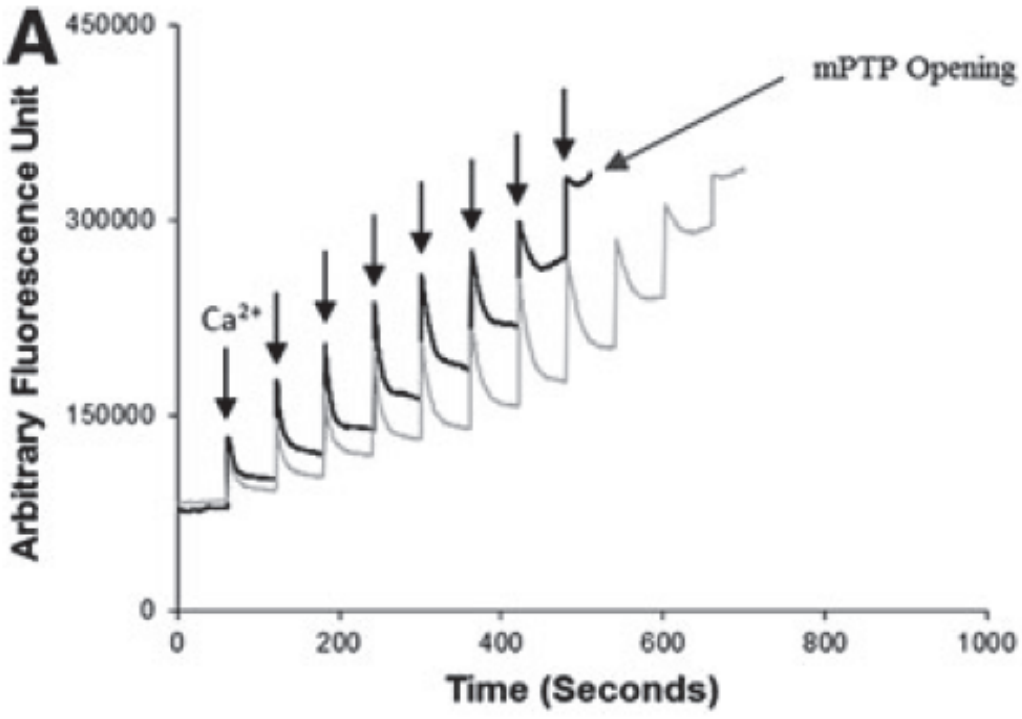


Figure 18: Graphique représentant la capacité de rétention calcique du mPTP: pics de calcium ajoutés à la suspension de mitochondries avant ouverture du pore (unité arbitraire de fluorescence en ordonnées sur échelle de temps en abscisses)

Etude de l'apoptose en caspase 3

Dans une deuxième série d'expériences, Nous avons choisi d'étudier l'apoptose cellulaire, conséquence de l'ouverture du mPTP, par l'étude du marquage immunohistochimique de la caspase 3. Cette étude nous a permis une analyse quantitative spécifique de la voie d'apoptose mitochondriale.

En suivant le même protocole, l'anesthésie était levée après le TC (ou temps équivalent pour les sham) et après administration de rhEpo ou Cepo ou NaCl 0,9% (n = 5 rats par groupe). Vingt quatre heures après, les rats étaient sacrifiés par décapitation et le cerveau était extrait afin de réaliser les analyses immunohistochimiques. Les coupes étaient analysées par un examinateur aveugle du traitement reçu. Pour chaque animal, l'apoptose cellulaire était déterminée en comptant le nombre de cellules positives en caspase 3 par mm^2 sur 4 coupes de cortex, avec 16 points de vue analysés par coupe de cortex (Figure 19).

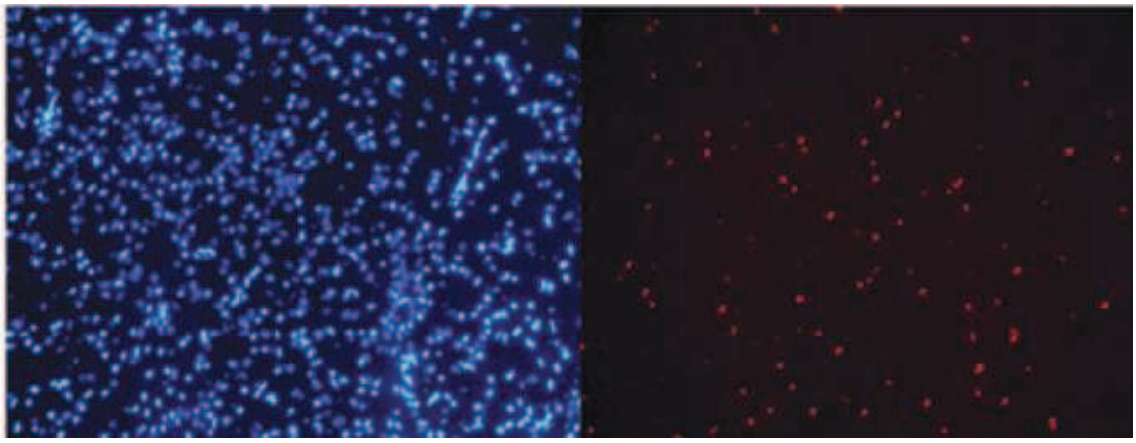


Figure 19: Images de microscopie de noyaux cellulaires avec marquage DAPI à gauche en bleu et caspase 3 positifs à droite en rouge

Etude du calcium intra mitochondrial

Cette étude nous a permis d'identifier si l'effet anti apoptotique de la rhEpo ou de la CEpo passait par le biais d'une modulation de la quantité de Ca intra mitochondriale, le Ca étant l'inducteur le plus puissant du mPTP et un intervenant principal de la cascade excito toxique intervenant dans la dysfonction mitochondriale. La quantité de calcium intra mitochondriale totale était mesurée sur des échantillons de protéines mitochondriales après minéralisation par spectrométrie. Les mesures étaient effectuées en partenariat avec le Service Central d'Analyse (CNRS, Vernaison, France). Les résultats étaient exprimés en µg Calcium total par

milligramme de protéines mitochondriales (n = 5 rats/groupe). Une mesure du Ca ionisé a également été réalisée.

Mon implication dans ce travail a consisté en la réalisation des manipulations IRM en collaboration avec le Dr Pierre Bouzat et le Dr Thibaut Trouve Buisson et des manipulations sur mitochondries avec l'aide du Dr Cécile Batandier du LBFA. La microscopie électronique a été réalisée en collaboration avec le Dr Karin Pernet-Gallay de la plateforme de microscopie électronique du GIN et de Julie Delaroche. J'ai également participé à la rédaction de l'article, la présentation des données et l'analyse statistique.
Ce travail a fait l'objet d'une présentation orale aux congrès de la SFAR et de la SRLF.

JOURNAL OF NEUROTRAUMA 33:1625–1633 (September 1, 2016)
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/neu.2015.4160

Erythropoietin and Its Derivates Modulate Mitochondrial Dysfunction after Diffuse Traumatic Brain Injury

Anne Millet,[1–3] Pierre Bouzat,[1,2,4] Thibaut Trouve-Buisson,[1,2,4] Cécile Batandier,[5] Karin Pernet-Gallay,[1,2] Lucie Gaide-Chevronnay,[1,2,4] Emmanuel L. Barbier,[1] Thierry Debillon,[3] Eric Fontaine,[5,6] and Jean-François Payen[1,2,4]

Abstract

Inhibiting the opening of mitochondrial permeability transition pore (mPTP), thereby maintaining the mitochondrial membrane potential and calcium homeostasis, could reduce the induction of cell death. Although recombinant human erythropoietin (rhEpo) and carbamylated erythropoietin (Cepo) were shown to prevent apoptosis after traumatic brain injury (TBI), their impact on mPTP is yet unknown. Thirty minutes after diffuse TBI (impact-acceleration model), rats were intravenously administered a saline solution (TBI-saline), 5000 UI/kg rhEpo (TBI-rhEpo) or 50 μg/kg Cepo (TBI-Cepo). A fourth group received no TBI insult (sham-operated) ($n = 11$ rats per group). Post-traumatic brain edema was measured using magnetic resonance imaging. A first series of experiments was conducted 2 h after TBI (or equivalent) to investigate the mitochondrial function with the determination of thresholds for mPTP opening and ultrastructural mitochondrial changes. In addition, the intramitochondrial calcium content [Ca_{im}] was measured. In a second series of experiments, brain cell apoptosis was assessed at 24 h post-injury. TBI-rhEpo and TBI-Cepo groups had a reduced brain edema compared with TBI-saline. They had higher threshold for mPTP opening with succinate as substrate: 120 (120–150) (median, interquartiles) and 100 (100–120) versus 80 (60–90) nmol calcium/mg protein in TBI-saline, respectively ($p < 0.05$). Similar findings were shown with glutamate-malate as substrate. TBI-rhEpo and Cepo groups had less morphological mitochondrial disruption in astrocytes. The elevation in [Ca_{im}] after TBI was not changed by rhEpo and Cepo treatment. Finally, rhEpo and Cepo reduced caspase-3 expression at 24 h post-injury. These results indicate that rhEpo and Cepo could modulate mitochondrial dysfunction after TBI. The mechanisms involved are discussed.

Key words: brain edema; erythropoietin; mitochondrial permeability; transition pore; traumatic brain injury

Introduction

Initial damage after traumatic brain injury (TBI) is followed by a cell death cascade activated in response to a variety of biochemical signals—e.g., excitotoxicity, alteration in calcium homeostasis, oxidative stress, and inflammation. Mitochondria appear to play a critical role amplifying these cell death signals and leading to apoptosis and/or necrosis. Experimental studies have shown morphological and functional post-injury abnormalities suggesting failure in mitochondrial respiration[1] with a decreased aerobic production of adenosine triphosphate (ATP) and anaerobic metabolism without evidence of cerebral ischemia.[2]

Post-traumatic accumulation of glutamate activates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors and facilitates the pathological cell accumulation of calcium. Large amounts of calcium can be accumulated in the mitochondrial matrix as well, causing the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) when the buffer capacity of the mitochondria is exceeded by high calcium concentrations.

The mPTP is a highly regulated, nonspecific, calcium-sensitive mitochondrial inner membrane channel.[3] Its opening after severe brain injury, or permeability transition phenomenon, leads to mitochondrial depolarization, failure of ATP production, and cell death.[3–5] Because of its central role in the deterioration of mitochondrial functions, mPTP has gained recent interest as a possible target for new neuroprotective interventions.[6,7] Accordingly, cyclosporin A (CsA), which inhibits the mPTP opening by binding a subunit of the pore—i.e., cyclophillin D—was shown to restore mitochondrial bioenergetics after focal TBI.[8]

[1]INSERM, U1216, Grenoble, France.
[2]Grenoble Institut des Neurosciences, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France.
[3]Département de Réanimation Pédiatrique et Néonatale, Hôpital Couple Enfant, Grenoble, France.
[4]Pôle d'Anesthésie Réanimation, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France.
[5]INSERM, U1055, Laboratoire de Biologie Fondamentale et Appliquée, Université Joseph Fourier, Grenoble, France.
[6]Unité de Nutrition Parentérale, Pôle de médecin Aigue Spécialisée, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France.

Recombinant human erythropoietin (rhEpo) has shown neuroprotective properties and reduction of neuronal death in numerous models of brain damage. In models of TBI, rhEpo-treated animals had reduced volume of injury, brain edema, neuroinflammatory response, and apoptosis, as well as improved neurological outcome.[9–12] We found that rhEpo-mediated reduction of post-traumatic brain edema could involve intracellular signaling pathways early[13] and improve brain oxygenation as well.[14] Similarly, carbamylated erythropoietin (Cepo), a modified erythropoietin lacking erythropoietic activity, reduced brain edema, cell loss, and improved neurological recovery after traumatic brain injury.[15–17]

Both rhEpo and Cepo showed a reduction in neuronal apoptosis after TBI or cerebral ischemia.[18–20] The effects of rhEpo and Cepo on mitochondrial function, however, have received little attention in brain trauma. Improvement in mitochondrial respiratory control and in ATP synthesis was found in rhEpo-treated rats after a focal model of TBI.[21] The anti-apoptotic effects of erythropoietin were associated with an inhibition of mPTP opening in a model of myocardial ischemia.[13,22,23]

No study has evaluated yet the effects of rhEpo and Cepo on mPTP opening in a TBI model. Considering the central role of mitochondria in cellular energetics, calcium homeostasis, and cell death, any evidence that these drugs could modulate mitochondrial function after TBI might reinforce their neuroprotective properties. On this basis, we hypothesized that rhEpo and Cepo could exert inhibiting effects on mPTP opening in our model of impact acceleration TBI.

Methods

Adult male Wistar rats (390–480 g) were studied in two series of experiments. In the first series of experiments, we investigated the effects of rhEpo and Cepo on the threshold for mPTP opening 2 h (H2) after TBI. Four groups of rats ($n = 11$ rats per group) were studied: TBI-saline received a saline treatment whereas TBI-rhEpo and TBI-Cepo were treated 30 min post-trauma with either rhEpo or Cepo, respectively. A sham-operated group with no TBI insult received saline. Post-traumatic brain edema was assessed using diffusion-weighted magnetic resonance images (MRI).

Assessment of mPTP activation was determined from thresholds for calcium retention capacity (CRC), which represents the minimum calcium load required to induce mPTP opening in an entire population of mitochondria. To determine potential mechanisms of action for rhEpo or Cepo, CRC tests were repeated in the presence of CsA, and the intra-mitochondrial calcium content [Ca_{im}] was measured. Finally, mitochondrial ultrastructural changes were studied for one rat per group at H2.

In the second series of experiments, we evaluated cell apoptosis 24 h after TBI using caspase-3 immunostaining ($n = 5$ rats per group).

TBI model and MRI

The study design was approved by the local Internal Evaluation Committee for Animal Welfare and Rights. Experiments were performed in accordance with the guidelines of the French Government (licenses 380819 and A3851610008). The experimental protocol was similar to the one described previously.[11,15]

Anesthesia was induced and maintained using isoflurane (inhaled fraction of 2.5%) during the study period. After tracheal intubation, rats were mechanically ventilated with 60% air–40% oxygen using a rodent ventilator (SAR-830/P, CWE, Ardmore, PA). Catheters were inserted into the femoral artery and vein for mean arterial blood pressure (MABP) monitoring and drug delivery. Blood gases (PaO_2 and $PaCO_2$), arterial oxygen saturation of hemoglobin (SaO_2), arterial pH (pHa), and hemoglobin content (tHb) were determined from arterial blood samples smaller than 0.1 mL (ABL 510, Radiometer, Copenhagen, Denmark). Rectal temperature was kept at 36.5 ± 0.5°C. Criteria for exclusion from the study were values outside the range of the following physiological parameters measured at 1 h (H1) after the reference time: MABP (<70 mm Hg), PaO_2 (<100 mm Hg), $PaCO_2$ (<30 mm Hg or >45 mm Hg), and tHb (<80 g/L).

Injury was induced by dropping a 500-g mass through a vertical cylinder from a height of 1.5 m on to a metallic disc glued to the central area of the skull vault between the coronal and lambdoid sutures, according to the initial description of the impact-acceleration model.[24] The reference time (H0) corresponded to the moment of impact (TBI-rhEpo, TBI-Cepo, and TBI-saline) or to an equivalent time (sham-operated). At 30 min after H0, animals were intravenously administered either 0.5 mL of an isotonic saline solution (TBI-saline), 5000 IU/kg of Epoetin alfa (Eprex,® Janssen-Cilag Division Ortho Biotech, Issy-les-Moulineaux, France), or 50 μg/kg of Cepo (H Lundbeck A/S, Valby, Denmark) diluted in 0.5 mL of saline (TBI-rhEpo and TBI-Cepo). The sham-operated rats were treated with saline and did not undergo TBI.

MRI was performed before and H2 after TBI or an equivalent time in sham-operated groups at 4.7T, in a horizontal bore magnet (Bruker Biospec 47/40 USR AV III, Bruker Biospin, Wissembourg, France). Diffusion-weighted images were acquired using a diffusion-weighted MR protocol similar to the one described previously.[15] Five adjacent rostrocaudal slices were acquired using a two-dimensional diffusion-weighted, spin-echo, single-shot echo-planar imaging (repetition time = 2500 msec; echo time = 30 msec; field of view = 30×30 mm^2; matrix = 64×64; 8 averages; voxel size $468 \times 468 \times 1000$ μm^3). This sequence was applied four times, once without diffusion weighting and three times with diffusion weighting ($b = 800$ s.mm^{-2}) in three orthogonal directions, to map the apparent diffusion coefficient (ADC). Acquisition duration lasted about 5 min.

Four regions of interest (ROI) were manually drawn on the T_2-weighted images and copied onto the ADC images: right and left parietal neocortex, right and left caudoputamen. ADC values of the four ROI were averaged, and mean ADC variation (delta ADC) was calculated at H2 in comparison with baseline: delta ADC = (ADC at H2 – ADC at H0)/ADC at H0.

Mitochondria extraction

In the first series of experiments, animals were sacrificed at H2 after TBI (or equivalent) by decapitation and brains were rapidly excised. The procedure was performed at 4°C. Once removal of cerebellum and meninges took place, whole brain tissue was placed in a Potter Elvejhem homogenizer containing buffer MSHE (225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 10 mM Hepes, 1 mM EGTA, pH 7.40) and crushed at 500 rounds per minute in the presence of bovine serum albumin (fatty acid free BSA 0.1%).

After 10 strokes, the homogenate then underwent four successive differential centrifugations. The first one was conducted at 2000*g* for 4 min to remove cellular debris and nuclei. The supernatant was thereafter centrifugated at 12,000*g* during 10 min, carefully removed, and the pellet was resuspended in MSHE-BSA buffer and incubated with 0.02% digitonin during 4 min for permeabilizing synaptosomes. The pellet was then subjected to two final centrifugations at 12,000*g* for 10 min each and resuspended in buffer isolation. The protein concentration of the suspension was assessed at the beginning of each procedure by determining protein concentration in the suspension, according to the Bradford technique.[25] The yield of mitochondria was set 0.5 mg/mL suspension buffer for each animal. Once extracted, fresh mitochondria were used within 4 h.

The quality of extracted mitochondria was assessed using oxygraphic analysis to measure mitochondrial respiratory rates. Oxygraphy used a Clark-type electrode (StrathKelvin, Scotland) at

37°C in a continuously stirred, sealed thermostatically controlled chamber. Isolated mitochondria at the concentration of 0.5 mg/mL were placed in the chamber containing respiration KET buffer (125 mM KCl, 1 mM EGTA, 20 mM Tris, pH 7.2) in the presence of 5 mM phosphate and BSA and tested with different inducers. After equilibration, glutamate-malate (GM) (5/2.5 mM) or succinate (5 mM), which are substrates of complexes I and II, respectively, were added. ADP (300 μM) was then added to initiate state III respiratory rate for 2 min, followed by the addition of oligomycin (1 μg/mL) to obtain a nonphosphorylating state for 2 min. The respiratory control ratio (RCR) was calculated dividing state III by nonphosphorylating state rates.

CRC

CRC was measured by spectrofluorimetry (PTI, Quantamaster C 61 spectrofluorimeter, Molecular Probes, Illkirch, France) at 30°C, as a suitable method to quantify and compare the potency of different mPTP regulators.[26–28] A mitochondria sample (0.5 mg/mL) was placed into the conservative CRC buffer containing 10 mM Tris Mops, 250 mM sucrose, 1 mM inorganic phosphate (pH 7.40) in a 1.4 mL cuvette. Pulses of 10 μM $CaCl_2$ were added at intervals of 60 sec until pore opening.

The extramitochondrial concentration of calcium was studied using fluorescent Ca^{2+}-sensitive indicator Calcium Green 5N (CaG5N) at a final concentration of 0.25 μM, with excitation and emission wavelengths of 506 nm and 530 nm, respectively. Two experimental conditions were tested per sample of mitochondria: addition of a substrate of complex II (succinate 5 mM) or a substrate of complex I (glutamate 5 mM-malate 2.5 mM) (Fig. 1). CRC tests were repeated in the presence of CsA 1 μM to explore the interaction with cyclophillin D.

Intramitochondrial calcium content

The intramitochondrial calcium content [Ca_{im}] was determined from pellets of 1 mg mitochondrial proteins after mineralization by HNO_3 ($n = 5$ rats per group). An induced coupled plasma atomic emission spectrometry was used (ICAP, Thermofisher Scientific, Bremen, Germany) at the Analytical Sciences Institute (CNRS, Lyon, France). Results were expressed as μg total calcium per milligram mitochondrial protein (μg Ca/mg protein).

Electron microscopy

In these experiments, rats were sacrificed by decapitation at H2 post-injury ($n = 1$ rat per group). The protocol was similar to the one described previously.[14,15] Brains were rapidly excised and cortex samples ($n = 3$ per rat) fixed in 2.5% glutaraldehyde (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4) for 24 h at room temperature. Samples were post-fixed in 1% osmium tetroxide (0.1 M cacodylate, pH 7.2) for 1 h at 4°C and stained with 1% uranyl acetate (pH 4) in water for 1 h at 4°C and dehydrated through graded alcohol concentrations before being embedded in Epoxy Embedding Medium (Fluka, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

Cortex brain ultrathin sections (60 nm-thickness) were stained with 5% uranile acetate and 0.4% lead citrate before being observed under a transmission electron microscope at 80 kV (Jeol 1200 EX, JEOL Ltd, Tokyo, Japan). Images were acquired with a digital camera (Veleta, SIS, Olympus, Munster, Germany). The analysis was performed by an examiner blinded to the treatment allocated to each rat on three cortex samples per rat, and at least more than 200 and 100 mitochondria were studied in astrocytes and neurons, respectively, for each sample. The thickness of mitochondrial cristae (nm) was determined to quantify ultrastructural damages after brain injury.[1]

Caspase-3 experiment

In the second series of experiments, following the same protocol, anesthesia was discontinued after the insult (or equivalent) and the administration of rhEpo, Cepo, or saline ($n = 5$ rats per group). Once returned to the animal facilities, rats were maintained within a 12-h light-dark cycle with humidity and temperature controlled at normal

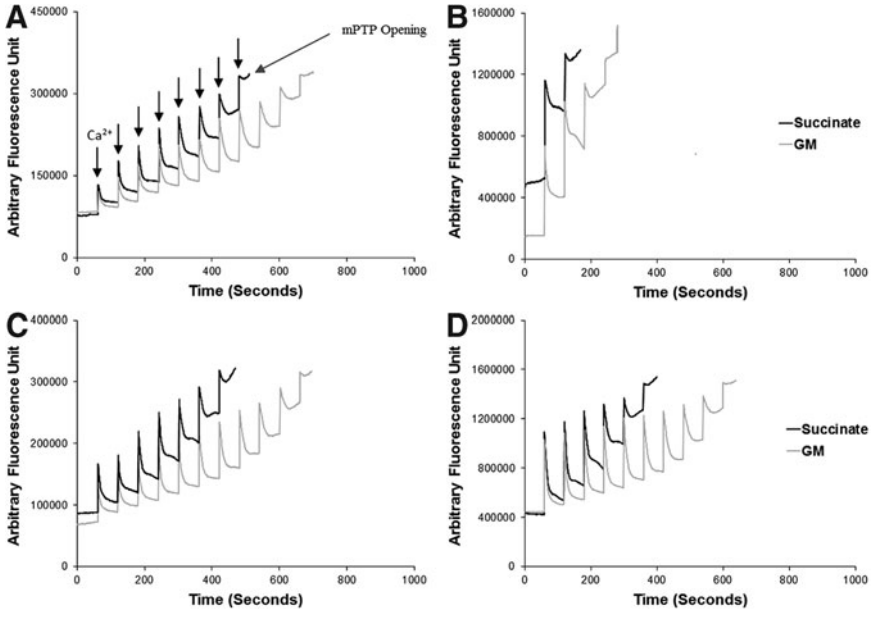


FIG. 1. Typical recordings of calcium retention capacity (CRC) experiments obtained from sham-operated (**A**), traumatic brain injury (TBI)-saline (**B**), TBI-recombinant human erythropoietin (**C**), and TBI-carbamylated erythropoietin (**D**) rats. CRC represents the minimum calcium load required to induce mitochondrial permeability transition pore opening in an entire population of mitochondria in the presence of succinate or glutamate-malate (GM) as substrates. Pulses of 10 μM $CaCl_2$ are added at intervals of 60 sec until pore opening.

levels and allowed food and water *ad libitum.* At 24 h post-injury, rats were sacrificed by decapitation. Brains were rapidly excised, cooled with isopentane, and cryopreserved at −80°C for 24 h.

Cortex brain sections (8 μm-thickness) from lateral ventricles and caudoputamen were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min, washed three times for 10 min each in a phosphate buffer saline 1X (PBS), and then permeabilized (PBS, Triton X100 0.3%, goat serum 5%) during 1 h at room temperature. Tissue sections were incubated overnight at 4°C with primary rabbit anticaspase-3 antibodies (Cleaved Caspase-3 [Asp175] antibody, 63 mg/mL, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) diluted at 1:1600 in the blocking solution (PBS, Triton X100 0.1%, Tween 0.1%, goat serum 1%). Sections were then washed again three times in PBS 1X before incubated in the dark for 1 h in blocking solution containing the secondary antibodies (CyTM3-conjugated monkey anti-rabbit IgG [H+L], 1.5 mg/mL, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) diluted at 1:1000 in the blocking solution. Sections were counterstained with Roti®-Mount FluorCare 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (Carl ROTH laboratories, Karlsruhe, Germany) to assess nuclear morphology.

Slices were analyzed by an examiner blinded to the treatment allocated to each rat using a Nikon epifluorescence microscope (Eclipse E600) equipped with a digital color camera (Olympus, Color View II, Munster, Germany) and analySIS software (Soft Imaging System v.5, Olympus, Munster, Germany). Data were processed with ImageJ software (Image Processing and Analysis in JAVA, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD).

For each animal, cell apoptosis was determined using a cell count analysis as the number of perinuclear caspase-3 positive cells per mm^2 in four cortex slices, and 16 fields of view were analyzed per parietal cortical slice. The percentage of caspase-3 positive cells was also noted on the same cortex slices. Results were expressed as the number of perinuclear caspase-3 positive cells per mm^2 and, between brackets, the percentage of caspase-3 positive cells in each group.

Statistical analysis

Data are expressed as median and interquartile range (25; 75th percentile) unless stated otherwise. The chi-square and the non-parametric Kruskal-Wallis tests were performed for categorical and continuous variables, respectively (intergroup analysis) (StatView SE program, SAS Institute, Cary, NC). Paired data were analyzed with the Wilcoxon test. Bonferroni correction was applied for multiple comparisons where appropriate. Statistical significance was declared when $p < 0.05$.

Results

MABP, PaO_2, $PaCO_2$, arterial pH, temperature, and tHb were comparable between the four groups during experiments (Table 1). At H2, the TBI-saline had a greater ADC variation compared with that found in other groups: delta ADC = −12.9% (-21.8; +9.9) (TBI-saline) *vs.* −3.3% (-7.3; −0.2) (TBI-rhEpo), −7.1% (−13.6; −0.3) (TBI-Cepo), and +2.4% (+1.3; +7.1) (sham-operated) (all $p < 0.05$ *vs.* TBI-saline) (Fig. 2).

Extracted mitochondria had RCR of 4.5–5.8 for complex II-III-IV and 12.7–14.1 for complex I-III-IV, indicating a good quality of extracted mitochondria. No difference in RCR was found between groups (data not shown). A significant difference in the CRC was found between the four groups of animals in the presence of either succinate or GM (Fig. 3). In the presence of succinate, the threshold for mPTP opening was higher in the TBI-rhEpo, TBI-Cepo, and sham-operated groups compared with that found with the TBI-saline group: 120 (120;150), 100 (100;120), and 120 (80;130) nmol calcium/mg protein versus 80 (60;90) nmol calcium/mg protein, respectively ($p < 0.05$). A higher threshold for opening mPTP in these three groups was also found with GM as substrate: 200 (180;220), 180 (160;195), and 200 (140;200) nmol calcium/mg protein for TBI-rhEpo, TBI-Cepo, and sham-operated groups, respectively versus 140 (110;160) for TBI-saline group ($p < 0.05$).

TABLE 1. PHYSIOLOGICAL DATA FROM THE FOUR GROUPS OF RATS (N = 11 RATS PER GROUP) IN THE FIRST SERIES OF EXPERIMENTS

Variables	*Sham-operated*	*TBI-saline*	*TBI-rhEpo*	*TBI-Cepo*
Weight (g)	430 ± 37	435 ± 39	433 ± 40	429 ± 33
MABP (mm Hg)	101 ± 21	95 ± 15	98 ± 24	96 ± 23
PaO_2 (mm Hg)	118 ± 11	119 ± 16	110 ± 10	114 ± 18
$PaCO_2$ (mm Hg)	37 ± 5	36 ± 6	35 ± 2	36 ± 4
Arterial pH	7.41 ± 0.06	7.39 ± 0.06	7.40 ± 0.05	7.40 ± 0.05
Temperature (°C)	36.7 ± 0.5	36.4 ± 0.4	36.5 ± 0.7	36.2 ± 0.5
Hemoglobin (g/L)	125 ± 17	125 ± 14	127 ± 13	123 ± 13

TBI, traumatic brain injury; rhEpo, recombinant human erythropoietin; Cepo, carbamylated erythropoietin; MABP, mean arterial blood pressure.
Data (mean ± standard deviation) were collected 1 h after the TBI impact (or equivalent time in sham-operated rats).

The addition of CsA to succinate or GM equally increased thresholds for mPTP opening in all groups compared with their baseline conditions (all $p < 0.05$) (Fig. 4). With succinate as substrate, CsA improved the CRC by 67% (44;75) in the sham group, 100% (75;120) in the TBI-saline group, 50% (50;75) in the TBI-rhEpo group, and 43% (40;75) in the TBI-Cepo group, respectively (all $p < 0.05$ vs. baseline). Similar results were found in the presence of GM as substrate (Fig. 4).

[Ca_{im}] was higher in the TBI-saline group compared with the sham-operated group: 0.31 (0.27–0.33) μg Ca_{im}/mg protein versus 0.18 (0.17–0.21) μg Ca_{im}/mg protein, respectively ($p = 0.02$). No difference was found across the three TBI groups (Fig. 5).

In ultrastructural mitochondrial analyses, mitochondrial cristae thickness of astrocytes was larger in the TBI-saline compared with that found with TBI-rhEpo, TBI-Cepo, and sham-operated groups: 41.4 (38.1–61.1) nm vs. 29.1 (23.8–37.7), 27.0 (20.7–35.2), and 23.3 (19.8–38.1) nm, respectively ($p < 0.05$) (Fig. 6A–F). This

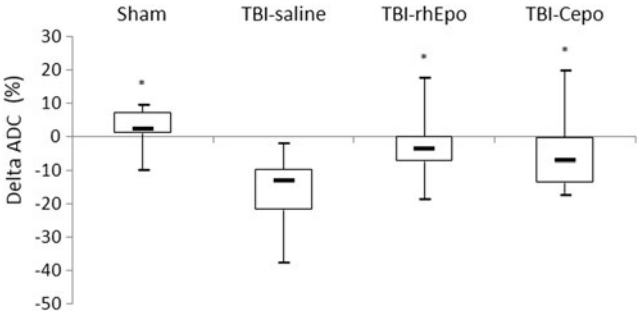


FIG. 2. Changes (in percent) in averaged apparent diffusion coefficient values (Δ apparent diffusion coefficient [ADC]) of water in the gray matter (included neocortex and caudoputamen) between baseline and 2 h after traumatic brain injury (TBI) (or equivalent time in sham-operated) in four groups of rats ($n = 11$ per group): sham-operated, TBI-saline, TBI-recombinant human erythropoietin (rhEpo), and TBI-carbamylated erythropoietin (Cepo). Boxplots show 25–75th percentile range (box) and 10–90th percentile (whiskers). *$p < 0.05$ vs. TBI-saline.

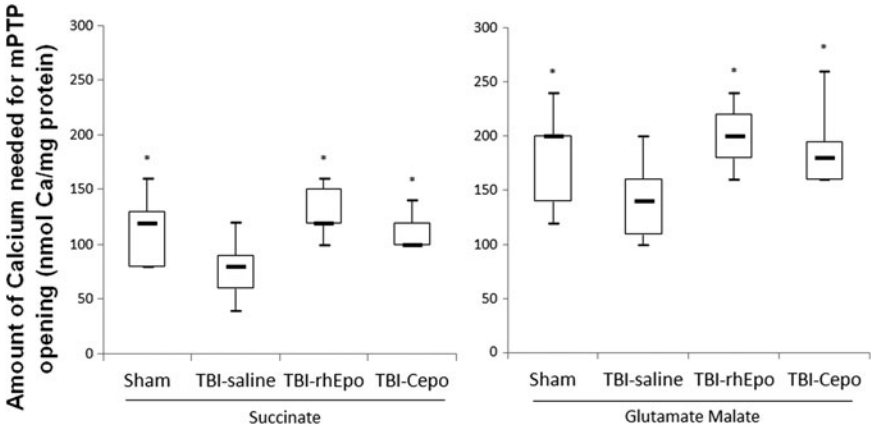


FIG. 3. Measurements of calcium retention capacity (CRC) in the four groups of rats ($n = 11$ per group): sham-operated, TBI-saline, TBI-recombinant human erythropoietin (rhEpo), and TBI-carbamylated erythropoietin (Cepo). CRC was expressed by the amount of calcium needed to open mitochondrial permeability transition pore (mPTP) from isolated brain mitochondria in the presence of succinate or glutamate-malate as substrates. Boxplots show 25–75th percentile range (box) and 10–90th percentile (whiskers). *$p < 0.05$ vs. TBI-saline.

morphological difference was not observed in neurons, however: 19.3 (16.3–23.4) nm (TBI-saline) vs. 19.4 (15.3–23.7) nm (TBI-rhEpo), 15.1 (12.8–19.3) nm (TBI-Cepo), and 18.4 (15.1–21.3) nm (sham-operated).

Cell apoptosis at 24 h differed between the four groups of rats. More apoptotic caspase-3 positive cells were found in the TBI-saline group per mm^2 by comparison with the other groups: 205 positive cells/mm^2 (179;215) in the TBI-saline group versus 161 positive cells/mm^2 (136;164) in the TBI-rhEpo group, 110 positive cells/mm^2 (65;150) in TBI-Cepo group, and 119 positive cells/mm^2 (86;121) in the sham-operated group ($p < 0.05$) (Fig. 7 and 8).

Discussion

The results of our study show that treatment with rhEpo and Cepo is associated with a modulation of mPTP opening after diffuse TBI. Specifically, the two TBI-treated groups had higher thresholds for mPTP opening and less ultrastructural mitochondria damages, together with attenuated brain edema, compared with the TBI-saline group. These results may extend the versatile properties of rhEpo or Cepo as powerful neuroprotective agents after brain injury and support the rationale of therapeutic strategies that target mitochondria.

Acute mitochondrial disruption has been known for years to occur after experimental TBI. This accounts for the clinical alterations in brain metabolism after TBI independently of brain ischemia, as evidenced in humans and in animals by cerebral microdialysis.[29–31] Increased levels of brain extracellular lactate were found in patients with TBI despite well-preserved regional blood flow and brain tissue oxygen tension, indicating a stimulation of anaerobic glycolysis because of an inefficiency of mitochondrial oxidative metabolism.[32,33]

Among mechanisms implicated in this post-traumatic dysfunction, the abnormal increase in intracellular calcium level is a key event in the pathogenesis of mitochondrial impairment. Intracellular calcium overload is partly absorbed by mitochondria, a phenomenon that increases intramitochondrial calcium content.[34] This leads to the generation of reactive oxygen species, mPTP opening, and activation of cell death cascades. Specifically, mitochondrial calcium overload induces the mitochondrial permeability

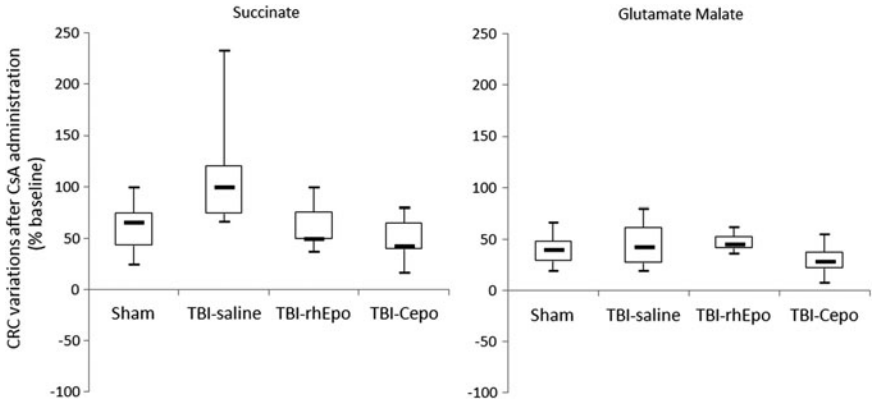


FIG. 4. Changes (in percent) in the calcium retention capacity (CRC) between baseline and addition of cyclosporine A (CsA) in the four groups of rats ($n = 11$ per group): sham-operated, TBI-saline, TBI-recombinant human erythropoietin (rhEpo), and TBI-carbamylated erythropoietin (Cepo). Boxplots show 25–75th percentile range (box) and 10–90th percentile (whiskers). All changes with CsA were significant compared to baseline ($p < 0.05$).

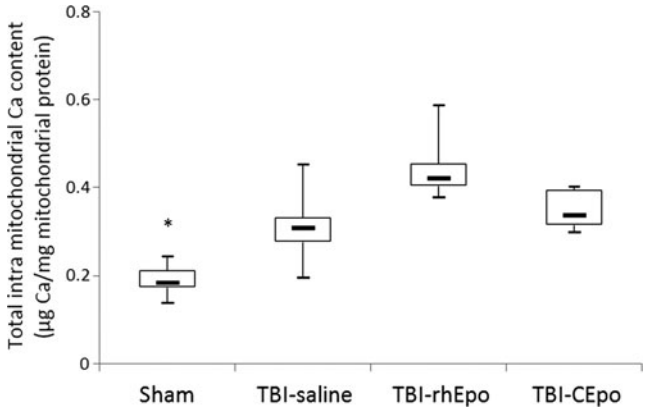


FIG. 5. Amount of intramitochondrial calcium content (μmol Ca/mg mitochondrial proteins) in the four groups of rats ($n = 5$ per group): sham-operated, TBI-saline, TBI-recombinant human erythropoietin (rhEpo), and TBI-carbamylated erythropoietin (Cepo). Boxplots show 25–75th percentile range (box) and 10–90th percentile (whiskers). *$p < 0.05$ vs. TBI-saline.

transition, a phenomenon involving a rapid increase of the inner mitochondrial membrane permeability to molecules weighing less than 1.5 kDa—e.g., protons and calcium.

This event is mediated by the opening of the mPTP, a large nonselective channel, whose basic unit is not elucidated yet.[6,35,36] Activation of the mPTP compromises the process of ATP production from a dissipation of protons into the matrix and loss of mitochondrial transmembrane potential, and allows the release into the cytosol of potent triggers of apoptosis—i.e., cytochrome-c, apoptosis inducing factor (AIF), and endonuclease G.

In the present study, mPTP activation was promoted after diffuse TBI in a similar way to that occurring in models of focal TBI.[1,8] Our TBI-saline rats had higher [Ca_{im}] and reduced CRC measurements 2 h after the impact compared with sham-operated rats. In addition, more ultrastructural damages were found post-trauma. These findings are in line with the alteration of mitochondrial calcium buffer capacity reported 3 h and 12 h after focal TBI.[1] This indicates that our model of diffuse TBI, which induces post-traumatic diffuse cellular edema (Fig. 2) as found previously,[11,13,15] might have induced early mitochondrial damage 2 h post-injury.

Our study shows that rhEpo and Cepo increases brain mitochondria resistance to calcium overload stress through limiting the

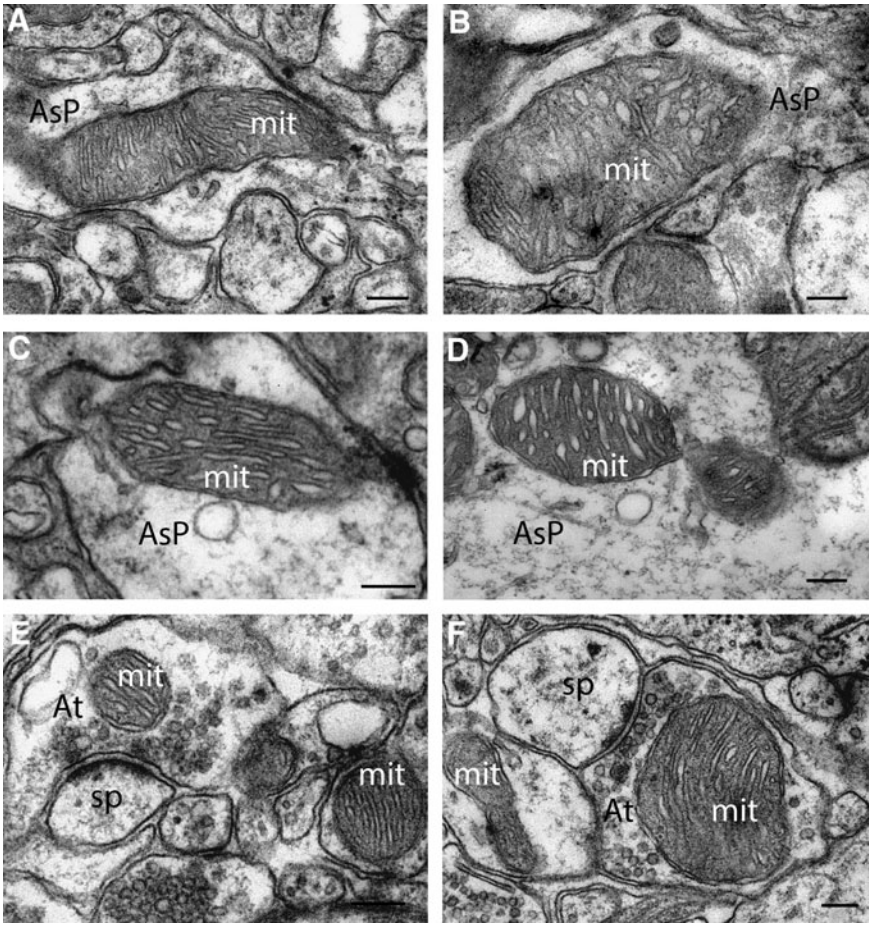


FIG. 6. Ultrastructural analysis of mitochondria of cortical tissue in sham-operated (**A** and **E**), TBI-saline (**B** and **F**), TBI-recombinant human erythropoietin (rhEpo) (**C**) and TBI-carbamylated erythropoietin (Cepo) (**D**) at 2 h post-trauma (or equivalent for sham). Mitochondria from astrocytic processes (A–D) and neurons (E, F) are shown. In TBI saline rat (B), a remodeling of the morphology of mitochondria is observed in astrocytes. Reduced mitochondria damages are observed with rhEpo (C) or Cepo (D). Difference in the morphology of the mitochondria in neurons is not apparent between sham-operated (E) and TBI-saline (F). AsP, astrocytic processes; mit, mitochondria; At, axon terminal; sp, dendritic spine. Bar: 200 nm.

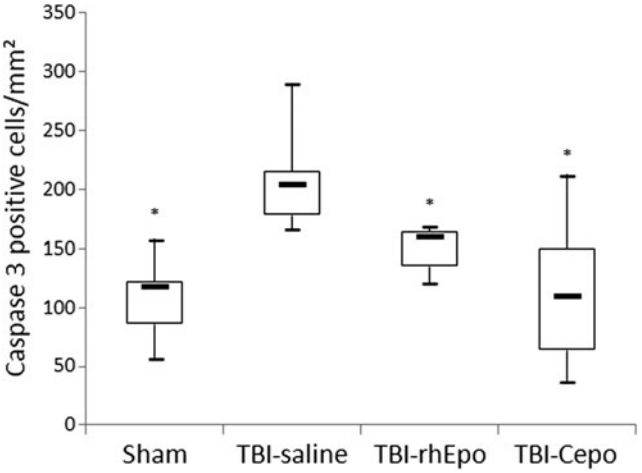


FIG. 7. Quantification of brain cell apoptosis as expressed by the number of caspase 3 positive cells per mm^2 in the four groups of rats at 24 h after TBI (or equivalent time in sham-operated) in four groups of rats ($n=5$ per group): sham-saline, TBI-saline, TBI-recombinant human erythropoietin (rhEpo), and TBI-carbamylated erythropoietin (Cepo). Boxplots show 25–75th percentile range (box) and 10–90th percentile (whiskers). *$p<0.05$ vs. TBI-saline.

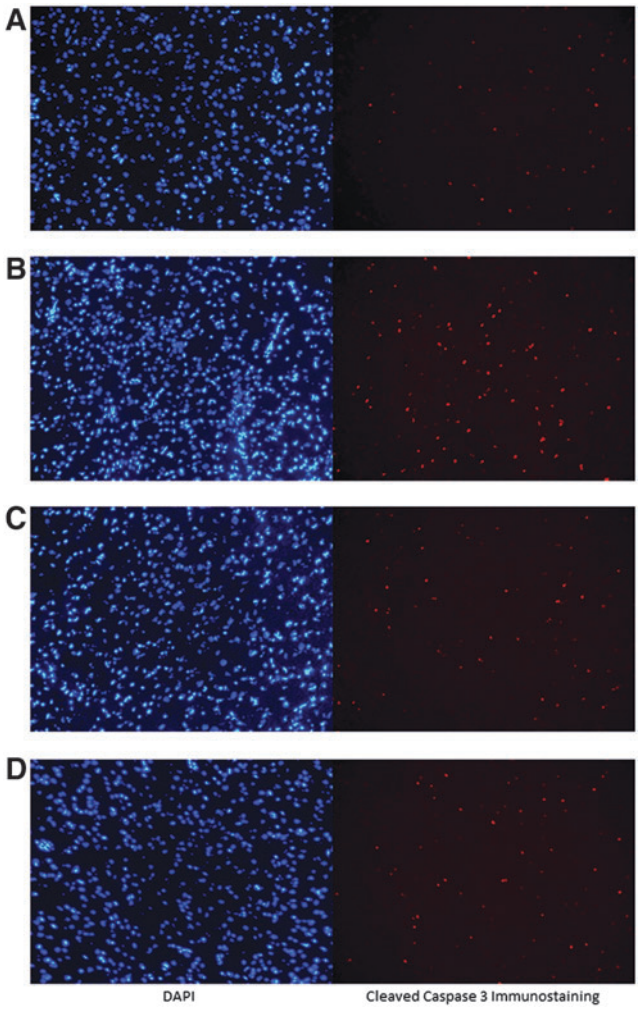


FIG. 8. Nuclear 4′,6′-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (left) and perinuclear caspase 3 (right) immunostaining of sham (**A**), TBI-saline (**B**), TBI-recombinant human erythropoietin (**C**), and TBI-carbamylated erythropoietin (**D**) groups (x20). At 24 h post-trauma, the TBI-saline group showed a marked expression of caspase 3 in the cortex. Color image is available online at www.liebertpub.com/neu

decrease in the threshold for mPTP opening as early as 2 h post-injury. These findings add to the neuroprotective effects of these two agents found in a variety of numerous models of brain damage.[9–12,15–20] Our results suggest, however, that the drug-induced effects on mPTP might not be mediated through intramitochondrial calcium overload because no difference in $[Ca_{im}]$ was found within the three TBI groups. In addition, CsA equally enhanced these drug-induced effects on mitochondrial resistance to calcium overload.

CsA is a potent inhibitor of the mPTP because of its interaction with cyclophyllin D.[37] A reduction of post-trauma diffuse axonal lesions was shown with brain parenchyma concentrations ranged from 0.898 ± 0.098 to 3.580 ± 0.317 μM,[38] suggesting that addition of 1 μM CsA in our CRC tests was appropriate to obtain complete saturation of binding sites with cyclophyllin D. Collectively, these findings indicate that the effects of rhEpo and Cepo on mPTP might not be mediated through a residual interaction with cyclophyllin D.

Our model of diffuse TBI is also a potent inducer of cell apoptosis as assessed 24 h after trauma. Using a similar model of diffuse TBI, trauma-induced mitochondrial alterations led to a gradual release of cytochrome-c and the activation of caspase-3 in damaged axons from 60 min to 360 min post-injury.[39] Even more apoptotic cells were found 24 h after a focal TBI in mice.[20] Caspase-3 is one of factors to trigger mitochondrial apoptosis after mPTP activation: the expression of cleaved caspase-3 markedly decreased under CsA treatment together with specific inhibition of mPTP and apoptosis pathways in a model of subarachnoid hemorrhage.[40]

In the present study, whether the insult directly caused a subsequent activation of cell apoptosis mediated by cytochrome-c release from mitochondria remains to be established. Nevertheless, we found a reduced cell apoptosis in the rhEpo- and Cepo-treated groups, as found elsewhere.[18–20]

At present, we can only formulate conjectures to explain our main findings. These could be mediated through the activation of intracellular signaling pathways by rhEpo and Cepo—namely, the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK) pathway. The RISK pathway includes the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt and the extracellular-regulated kinase (ERK)-1/-2, and protects from cell death by phosphorylation of Bcl-2 family proteins and inhibition of the mPTP.[5] In other terms, the activation of this pathway might modulate mPTP opening independently of changes in intramitochondrial calcium content.

There is some evidence that the RISK pathway could be modulated by rhEpo, which was shown to reduce apoptosis in various models of tissue injuries.[18,22,23,41] This signaling pathway is also involved in the antiedematous effect of rhEpo found in our TBI model.[13] In addition, binding of rhEpo to its receptor on the endothelial cells lead to the activation of the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway,[42] which causes endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and subsequent brain vasodilation.[43] This mechanism was possibly involved in the beneficial impact of rhEpo on brain oxygenation after TBI.[14] Further studies are obviously needed to determine the relationship between these signaling pathways, mPTP, and rhEpo after TBI.

There are some limitations with this study. First, the CRC was assessed only 2 h post-trauma. This timing was chosen to explore

the early effects, if any, of rhEpo and Cepo on the injured mitochondria, as have been previously found with the time course of rhEpo and Cepo to reduce the development of brain edema in this model.[11,13] Consistent with this timing was the alteration of the cortical mitochondrial-calcium-buffering capacity found at 3 and 12 h, not at 30 min, in a mouse model of focal TBI.[1] Whether the effects of rhEpo or Cepo on the CRC can be sustained for several hours after trauma should deserve further investigations.

Second, we explored *in vitro* mitochondrial function during conditions that might have been not controlled for factors possibly involved in mPTP *in vivo*—e.g., intracellular concentration of ADP or Mg^{++}. Third, caspase-3 was used to assess the activation of the mitochondrial apoptosis pathway. Other potent triggers of apoptosis—i.e., cytochrome-c levels and AIF into the cytosol—could have been considered. They are not specific of mPTP activation, however.

Fourth, cell apoptosis is usually assessed later than 24 h post-injury. In a similar model of diffuse TBI, the apoptotic cascade started 24 h post-trauma and was maximal 3 days after the insult.[44] On the other hand, caspase-3 activation was found to occur as early as 60–360 min in a model of diffuse TBI.[39] A significant decrease of cell apoptosis was found in cortical neurons in rhEpo-treated animals 24 h after a focal TBI.[20] Although a delayed timing to study cell apoptosis would have been more appropriate, our results are consistent with the expected effects of TBI and of rhEpo on cell apoptosis.

Conclusion

A mitochondrial dysfunction was found after diffuse TBI in rats. Post-injury treatment with rhEpo or Cepo decreased TBI-induced mPTP opening. These findings add to the versatile properties of erythropoietin as a neuroprotective agent and may reinforce the rationale for targeting the mPTP in TBI studies.

Acknowledgments

This study was conducted at the INSERM U836/Grenoble Institut des Neurosciences and was supported in part by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Association pour la Recherche en Néonatologie, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Ministère de l'Education, de la Recherche et de la Technologie, and Fondation des Gueules Cassées. Epoietin alpha (Eprex®) was kindly provided by Janssen-Cilag Division Ortho Biotech, Issy-les-Moulineaux, France. Carbamylated erythropoietin (Cepo) was kindly provided by H Lundbeck A/S, Valby, Denmark. Brain MRI was performed at the Grenoble MRI Facility (IRMaGe). The MRI facility IRMaGe is partly funded by the French program ''Investissement d'avenir'' run by the French National Research Agency. The authors wish to thank Alexia Daoust, Regine Farion, Julie Delaroche, and Anne Bertrand (Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, France), Danielle Gonnet and Linda Ayouni (Analytic Science Institute, Lyon, France) for their great assistance during experiments.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Singh, I.N., Sullivan, P.G., Deng, Y., Mbye, L.H., and Hall, E.D. (2006). Time course of post-traumatic mitochondrial oxidative damage and dysfunction in a mouse model of focal traumatic brain injury: implications for neuroprotective therapy. J. Cereb. Blood Flow Metab. 26, 1407–1418.
2. Lifshitz, J., Sullivan, P.G., Hovda, D.A., Wieloch, T., and McIntosh, T.K. (2004). Mitochondrial damage and dysfunction in traumatic brain injury. Mitochondrion 4, 705–713.
3. Zoratti, M., and Szabo, I. (1995). The mitochondrial permeability transition. Biochim. Biophys. Acta 1241, 139–176.
4. Mazzeo, A.T., Beat, A., Singh, A., and Bullock, M.R. (2009). The role of mitochondrial transition pore, and its modulation, in traumatic brain injury and delayed neurodegeneration after TBI. Exp. Neurol. 218, 363–370.
5. Rasola, A., Sciacovelli, M., Pantic, B., and Bernardi, P. (2010). Signal transduction to the permeability transition pore. FEBS Lett. 584, 1989–1996.
6. Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., and Kroemer, G. (2009). Targeting post-mitochondrial effectors of apoptosis for neuroprotection. Biochim. Biophys. Acta 1787, 402–413.
7. Merenda, A., and Bullock, R. (2006). Clinical treatments for mitochondrial dysfunctions after brain injury. Curr. Opin. Crit. Care 12, 90–96.
8. Sullivan, P.G., Thompson, M.B., and Scheff, S.W. (1999). Cyclosporin A attenuates acute mitochondrial dysfunction following traumatic brain injury. Exp. Neurol. 160, 226–234.
9. Mammis, A., McIntosh, T.K., and Maniker, A.H. (2009). Erythropoietin as a neuroprotective agent in traumatic brain injury. Review. Surg. Neurol. 71, 527–531.
10. Velly, L., Pellegrini, L., Guillet, B., Bruder, N., and Pisano, P. (2010). Erythropoietin 2nd cerebral protection after acute injuries: a double-edged sword? Pharmacol. Ther. 128, 445–459.
11. Verdonck, O., Lahrech, H., Francony, G., Carle, O., Farion, R., Van de Looij, Y., Remy, C., Segebarth, C., and Payen, J.F. (2007). Erythropoietin protects from post-traumatic edema in the rat brain. J. Cereb. Blood Flow Metab. 27, 1369–1376.
12. Wenker, S.D., Chamorro, M.E., Vittori, D.C., and Nesse, A.B. (2013). Protective action of erythropoietin on neuronal damage induced by activated microglia. FEBS J. 280, 1630–1642.
13. Valable, S., Francony, G., Bouzat, P., Fevre, M.C., Mahious, N., Bouet, V., Farion, R., Barbier, E., Lahrech, H., Remy, C., Petit, E., Segebarth, C., Bernaudin, M., and Payen, J.F. (2010). The impact of erythropoietin on short-term changes in phosphorylation of brain protein kinases in a rat model of traumatic brain injury. J. Cereb. Blood Flow Metab. 30, 361–369.
14. Bouzat, P., Millet, A., Boue, Y., Pernet-Gallay, K., Trouve-Buisson, T., Gaide-Chevronnay, L., Barbier, E.L., and Payen, J.F. (2013). Changes in brain tissue oxygenation after treatment of diffuse traumatic brain injury by erythropoietin. Crit. Care Med. 41, 1316–1324.
15. Bouzat, P., Francony, G., Thomas, S., Valable, S., Mauconduit, F., Fevre, M.C., Barbier, E.L., Bernaudin, M., Lahrech, H., and Payen, J.F. (2011). Reduced brain edema and functional deficits after treatment of diffuse traumatic brain injury by carbamylated erythropoietin derivative. Crit. Care Med. 39, 2099–2105.
16. Mahmood, A., Lu, D., Qu, C., Goussev, A., Zhang, Z.G., Lu, C., and Chopp, M. (2007). Treatment of traumatic brain injury in rats with erythropoietin and carbamylated erythropoietin. J. Neurosurg. 107, 392–397.
17. Xiong, Y., Mahmood, A., Zhang, Y., Meng, Y., Zhang, Z.G., Qu, C., Sager, T.N. and Chopp, M. (2011). Effects of posttraumatic carbamylated erythropoietin therapy on reducing lesion volume and hippocampal cell loss, enhancing angiogenesis and neurogenesis, and improving functional outcome in rats following traumatic brain injury. J. Neurosurg. 114, 549–559.
18. Zhi, X.G., Shi, Q.H., and He, Z.H. (2008). Recombinant human erythropoietin administration protects cortical neurons from traumatic brain injury in rats. Eur. J. Neurol. 15, 140–149.
19. Wang, Y., Zhang, Z.G., Rhodes, K., Renzi, M., Zhang, R.L., Kapke, A., Lu, M., Pool, C., Heavner, G., and Chopp, M. (2007). Post-ischemic treatment with erythropoietin or carbamylated erythropoietin reduces infarction and improves neurological outcome in a rat model of focal cerebral ischemia. Br. J. Pharmacol. 151, 1377–1384.
20. Yatsiv, I., Grigoriadis, N., Simeonidou, C., Stahel, P.F., Schmidt, O.I., Alexandrovitch, A.G., Tsenter, J., and Shohami, E. (2005). Erythropoietin is neuroprotective, improves functional recovery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury. FASEB J. 19, 1701–1703.
21. Xiong, Y., Chopp, M., and Lee, C.P. (2009). Erythropoietin improves brain mitochondrial function in rats after traumatic brain injury. Neurol. Res. 31, 496–502.

22. Kobayashi, H., Miura, T., Ishida, H., Miki, T., Tanno, M., Yano, T., Sato, T., Hotta, H., and Shimamoto, K. (2008). Limitation of infarct size by erythropoietin is associated with translocation of Akt to the mitochondria after reperfusion. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 35, 812–819.
23. Nishihara, M., Miura, T., Miki, T., Tanno, M., Yano, T., Naitoh, K., Ohori, K., Hotta, H., Terashima, Y., and Shimamoto, K. (2007). Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection. J. Mol. Cell Cardiol. 43, 564–570.
24. Marmarou, A., Foda, M.A., van den Brink, W., Campbell, J., Kita, H., and Demetriadou, K. (1994). A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. J. Neurosurg. 80, 291–300.
25. Hammond, J.B., and Kruger, N.J. (1988). The bradford method for protein quantitation. Methods Mol. Biol. 3, 25–32.
26. Lablanche, S., Cottet-Rousselle, C., Lamarche, F., Benhamou, P.Y., Halimi, S., Leverve, X., and Fontaine, E. (2011). Protection of pancreatic INS-1 beta-cells from glucose- and fructose-induced cell death by inhibiting mitochondrial permeability transition with cyclosporin A or metformin. Cell Death Dis. 2, e134.
27. Schinzel A.C., Takeuchi, O., Huang, Z., Fisher, J.K., Zhou, Z., Rubens, J., Hetz, C., Danial, N.N., Moskowitz, M.A., and Korsmeyer, S.J. (2005). Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 12005–12010.
28. Hansson, M.J., Morota, S., Chen, L., Matsuyama, N., Suzuki, Y., Nakajima, S., Tanoue, T., Omi, A., Shibasaki, F., Shimazu, M., Ikeda, Y., Uchino, H., and Elmer, E. (2011). Cyclophilin D-sensitive mitochondrial permeability transition in adult human brain and liver mitochondria. J. Neurotrauma 28, 143–153.
29. Bergsneider, M., Hovda, D.A., Shalmon, E., Kelly, D.F., Vespa, P.M., Martin, N.A., Phelps, M.E., Phelphs, M.E., McArthur, D.L., Caron, M.J., Kraus, J.F., and Becker, D.P. (1997). Cerebral hyperglycolysis following severe traumatic brain injury in humans: a positron emission tomography study. J. Neurosurg. 86, 241–251.
30. Vespa, P., Bergsneider, M., Hattori, N., Wu, H.M., Huang, S.C., Martin, N.A., Glenn, T.C., McArthur, D.L., and Hovda, D.A. (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.
31. Yoshino, A., Hovda, D.A., Kawamata, T., Katayama, Y., and Becker, D.P. (1991). Dynamic changes in local cerebral glucose utilization following cerebral conclusion in rats: evidence of a hyper- and subsequent hypometabolic state. Brain Res. 561, 106–119.
32. Sala, N., Suys, T., Zerlauth, J.B., Bouzat, P., Messerer, M., Bloch, J., Levivier, M., Magistretti, P.J., Meuli, R. and Oddo, M. (2013). Cerebral extracellular lactate increase is predominantly nonischemic in patients with severe traumatic brain injury. J. Cereb. Blood Flow Metab. 33, 1815–1822.
33. Zauner, A., Doppenberg, E., Woodward, J.J., Allen, C., Jebraili, S., Young, H.F., and Bullock, R. (1997). Multiparametric continuous monitoring of brain metabolism and substrate delivery in neurosurgical patients. Neurol. Res. 19, 265–273.
34. Xiong, Y., Gu, Q., Peterson, P.L., Muizelaar, J.P., and Lee, C.P. (1997). Mitochondrial dysfunction and calcium perturbation induced by traumatic brain injury. J. Neurotrauma 14, 23–34.
35. Giorgio, V., von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., Glick, G.D., Petronilli, V., Zoratti, M., Szabo, I., Lippe, G., and Bernardi, P. (2013). Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 5887–5892.
36. Alavian, K.N., Beutner, G., Lazrove, E., Sacchetti, S., Park, H.A., Licznerski, P., Li, H., Nabili, P., Hockensmith, K., Graham, M., Porter, G.A., Jr., and Jones, E.A. (2014). An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, 10580–10585.
37. Kilbaugh, T.J., Bhandare, S., Lorom, D.H., Saraswati, M., Robertson, C.L., and Margulies, S.S. (2011). Cyclosporin A preserves mitochondrial function after traumatic brain injury in the immature rat and piglet. J. Neurotrauma 28, 763–774.
38. Okonkwo, D.O., Melon, D.E., Pellicane, A.J., Mutlu, L.K., Rubin, D.G., Stone, J.R., and Helm, G.A. (2003). Dose-response of cyclosporin A in attenuating traumatic axonal injury in rat. Neuroreport 14, 463–466.
39. Buki, A., Okonkwo, D.O., Wang, K.K., and Povlishock, J.T. (2000). Cytochrome c release and caspase activation in traumatic axonal injury. J. Neurosci. 20, 2825–2834.
40. Xie, Z., Lei, B., Huang, Q., Deng, J., Wu, M., Shen, W., and Cheng, Y. (2012). Neuroprotective effect of Cyclosporin A on the development of early brain injury in a subarachnoid hemorrhage model: a pilot study. Brain Res. 1472, 113–123.
41. Zhao, J., Li, G., Zhang, Y., Su, X., and Hang, C. (2011). The potential role of JAK2/STAT3 pathway on the anti-apoptotic effect of recombinant human erythropoietin (rhEPO) after experimental traumatic brain injury of rats. Cytokine 56, 343–350.
42. Kilic, E., Kilic, U., Soliz, J., Bassetti, C.L., Gassmann, M., and Hermann, D.M. (2005). Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK-1/-2 and Akt pathways. FASEB J 19, 2026–2028.
43. Cherian, L., Goodman, J.C., and Robertson, C. (2007). Neuroprotection with erythropoietin administration following controlled cortical impact injury in rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 322, 789–794.
44. Cernak, I., Chapman, S.M., Hamlin, G.P., and Vink, R. (2002). Temporal characterisation of pro- and anti-apoptotic mechanisms following diffuse traumatic brain injury in rats. J. Clin. Neurosci. 9, 565–572.

Address correspondence to:
Jean-François Payen, MD, PhD
Grenoble Institut des Neurosciences
INSERM U836/Equipe 5
Université Joseph Fourier
Site santé de la Tronche, BP 170
Grenoble Cedex 9, 38042
France

E-mail: jfpayen@ujf-grenoble.fr

d. Résultats

Dans l'étude 3, nous avons mis en évidence des effets bénéfiques de la rhEpo en termes de protection cérébrale contre l'apoptose.

Dans notre modèle, notre étude a mis en évidence une ouverture précoce du mPTP, responsable d'une apoptose mitochondriale caspase dépendante à H2 d'un TC diffus. Une injection post-traumatique de rhEpo 30 minutes après un TC diffus, permettait de retarder l'ouverture du mPTP et donc de diminuer l'apoptose cérébrale post traumatique d'origine mitochondriale. Cet effet ne passait pas par le biais d'une réduction du taux de calcium intra mitochondrial considéré comme le plus puissant inducteur de l'ouverture du pore et retrouvé en excès à la suite d'un TC. Cet effet n'impliquait pas non plus la cyclophiline D comme l'effet de la rhEpo était additif à celui du la ciclosporine in vitro. D'autres hypothèses peuvent être alors soulevées comme l'intervention des voies de signalisation RISK (ERK 1/-2), déjà impliquées dans certains effets de la rhEpo soulevés par des études précédentes menées dans notre équipe (Valable, Francony et al. 2010) et dans des modèles d'ischémie myocardique avec apoptose induite par le mPTP. Dans l'étude de Nishihara et al. en 2007, des cœurs de rats étaient étudiés après avoir été soumis à une ischémie-reperfusion avec ou sans pré traitement par l'association de la rhEpo et d'un pré conditionnement ischémique (IPC) (Nishihara, Miura et al. 2007). Le groupe prétraité (rhEpo+IPC) présentait une augmentation de la forme phosphorylée de GSK3β, protéine antérieurement impliquée dans l'ouverture du mPTP. Le taux de complexes ANT-CyclD était diminué de 40%. Les auteurs en concluaient que la rhEpo, par le biais d'une phosphorylation de GSK3β, entrainait l'interaction phosphoGSK3β-ANT qui levait l'interaction ANT-CyclD et ainsi élevait le seuil d'ouverture du mPTP. Kobayashi et al. en 2008, dans un même modèle, retrouvaient que la rhEpo diminuait la taille de l'infarctus de manière associée à une élévation des formes phosphorylées mitochondriales de Akt, GS3Kβ et ERK et à une interaction Akt-ANT (Kobayashi, Miura et al. 2008). Tamareille et al. en 2009 ont fait les mêmes constatations. L'effet de la rhEpo était annulé par des inhibiteurs de PI3K et ERK ex vivo (Tamareille, Ghaboura et al. 2009).

e. Conclusion

Nous avons retrouvé que dans notre modèle survenait une dysfonction mitochondriale post traumatique responsable d'une apoptose cellulaire en lien avec l'ouverture précoce du mPTP.

La rhEpo et la CEpo, en plus d'un effet anti œdémateux, retardaient l'ouverture du mPTP et donc diminuaient l'apoptose cérébrale avec amélioration de la dysfonction mitochondriale morphologique post traumatique. Cet effet ne passait pas par une modulation du taux de calcium intra mitochondrial.

4. Etude 4 : Effet d'une solution hypertonique de lactate de sodium sur le métabolisme cérébral post traumatique.

a. Justification

Suite à nos résultats sur l'œdème cérébral, l'hypoxie tissulaire et sur le versant pro apoptotique de la dysfonction mitochondriale post traumatique, nous avons voulu nous intéresser plus au volet métabolique. Nous avons donc souhaité analyser la dysfonction mitochondriale fonctionnelle versant phosphorylation oxydative et le métabolisme cérébral post traumatique avec étude du lactate endogène intra cellulaire.

Des études récentes se sont intéressées à l'apport de lactate de sodium exogène au cours d'un TC du fait de nombreuses publications soulignant son effet bénéfique endogène comme substrat énergétique alternatif en post traumatique en conditions de neuroglucopénie. Nous avons voulu appliquer les différentes techniques de monitorage précédentes à des rats traités par du lactate de sodium hypertonique afin de comprendre plus précisément les mécanismes d'action de cette molécule sur l'œdème cérébral, l'hypoxie tissulaire post traumatique, la dysfonction mitochondriale et le métabolisme cérébral.

Nous avons ainsi étudié les effets d'une administration de lactate de sodium exogène, a) sur l'œdème cérébral et l'hypoxie cérébrale post traumatiques et sur le métabolisme cérébral évalué en IRM de diffusion/BOLD et en spectroscopie protons respectivement b) sur le diamètre des vaisseaux étudiés en IRM c) sur les modifications mitochondriales morphologiques évaluées en microscopie électronique ainsi que d) sur la dysfonction de la chaine respiratoire mitochondriale évaluée par oxygraphie.

b. Hypothèses

Nos hypothèses étaient que :

- A la suite du TC diffus survient un œdème cérébral avec hypoxie tissulaire cérébrale tout comme retrouvé dans nos deux études 1 et 2
- Une dysfonction mitochondriale fonctionnelle de la chaine respiratoire est présente après un TC diffus expérimental

- Une accumulation de lactate intracellulaire se produit après notre TC expérimental du fait d'une hyperglycolyse ou d'une dysfonction mitochondriale
- Le lactate de sodium molaire de par ses propriétés hypertoniques limite l'œdème cérébral et ainsi l'hypoxie tissulaire post traumatique
- Le lactate de sodium molaire en améliorant l'apport en O2 et en constituant un substrat alternatif pour le cerveau lésé, améliore la dysfonction mitochondriale post traumatique de la chaine respiratoire.
- En améliorant la fonction de la chaine repsiratoire, il améliore ainsi l'utilisation des substrats énergétiques disponibles et donc le métabolisme cérébral post TC en diminuant l'accumulation de lactate endogène utilisé pour le cerveau lésé.
- Par un effet vasodilatateur, le lactate de sodium améliore aussi le DSC et donc l'apport en O2 aux tissus.

c. Méthodes spécifiques

Thérapeutique étudiée

Dans l'étude 4, le lactate de sodium était injecté sous forme de débit continu dès 30 minutes après le TC à 0,5 ml/Kg/H sur 3H (1,5 mosm/Kg) chez les TC-lactate. Dans le groupe TC-saline, du NaCl 0,9% était injecté au même débit selon la même durée. Les groupes de rats non traumatisés recevaient les mêmes traitements.

Saturation tissulaire en O2, temps de transit moyen (TTM), volume sanguin cérébral (BVf) et diamère des vaisseaux (VSI) IRM

Cette étude était réalisée sur l'IRM 7T selon les mêmes modalités que l'étude 1. La mesure de la densité microvasculaire est réalisée par la mesure du Vessels Size Index (VSI). Cette mesure permet une analyse non invasive répétée globale du diamètre des vaisseaux. Elle permet l'analyse de la réactivité vasculaire dans des conditions normales ou pathologiques et permet d'attribuer à des thérapeutiques étudiées un effet de vasodilatation ou de vasoconstriction. Sa mesure implique une modification dans la relaxivité transverse qui est induite par l'injection intravasculaire d'un agent de contraste et l'acquisition d'une séquence multi gradient echo et spin-echo.

Spectroscopie protons

Dans l'étude 4, les séquences de SRM in vivo et d'IRM de diffusion pour objectiver l'œdème cérébral du modèle, ont été réalisées dans un aimant de 9,4T avant le TC (H0) puis répétées à H2 et H4 en post-TC. Les analyses spectroscopiques étaient réalisées afin d'évaluer les pics d'intensité de différentes molécules intervenant dans le métabolisme cérébral chez nos animaux et leurs variations après TC et administration de lactate, tels que le lactate, la créatine totale (TCr : somme créatine et phosphocréatine) et le N Acetyl Aspartate (NAA) (Figure 20). Cette mesure permet une analyse de ces molécules au niveau intracellulaire, contrairement aux techniques de microdialyse cérébrale, permettant d'interpréter les résultats obtenus et d'en déduire le comportement du métabolisme cérébral en lien avec l'analyse de la phosphorylation oxydative.

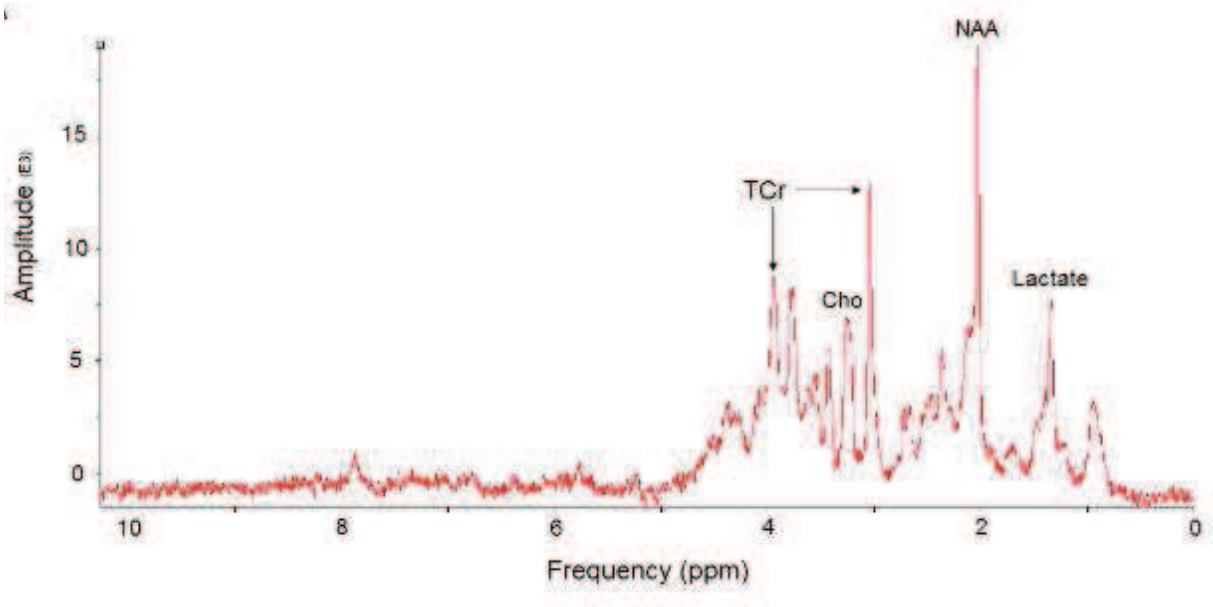


Figure 20: Spectre issu de l'analyse en spectroscopie H+ d'un rat TC-saline. TCr : Creatine et Phosphocréatine ; Cho : Choline ; NAA : N Acetyl Aspartate.

Chaine respiratoire mitochondriale

Après extraction mitochondriale, cette analyse était effectuée à l'aide d'une électrode de Clark dans un milieu contrôlé en continu sur le plan thermique circulant au sein d'une chambre contenant un tampon de respiration. Après équilibration, pour tester les complexes I-III-IV et II-III-IV, le Glutamate Malate ou le Succinate, substrats des complexes I et II respectivement, ont été ajoutés. L'ADP était alors introduit pour

initier l'état III pendant 2 minutes (ou stade de phosphorylation oxydative), suivi par l'addition d'oligomycine pour monitorer l'état IV de la respiration pendant deux autres minutes. Le rapport état III/ état IV correspond au respiratory control ratio (RCR) et sert à évaluer la fonctionnalité de la chaine respiratoire. Cette mesure tout comme la mesure de la CRC, sont des mesures in vitro des capacités maximales de la chaine respiratoire des mitochondries totales de l'animal testé. Il ne s'agit pas d'un reflet exact de la fonctionnalité de la chaine repsiratoire dans son milieu in vivo. Cependant, la comparaison des résultats du RCR des différents groupes de rats permet de conclure quant à l'altération de la chaine respiratoire dans les différentes conditions testées.

Dans ce travail, j'ai réalisé toutes les manipulations IRM et spectroscopiques, avec les aides de Vasile Stupar concernant la mise en place de la technique 1H-MRS sur la plateforme IRM du GIN et de Florence Fauvelle concernant l'interprétation des données des spectres de spectroscopie. J'ai encadré Adrien Cuisinier dans la réalisation de ses manipulations pour la partie hypoxie cérébrale et analyse du VSI et dans ses analyses statistiques. Ce travail a également été fait en collaboration avec le LBFA et Cécile Batandier concernant l'analyse de la chaine respiratoire des mitochondries. Benjamin Lemasson nous a aidés dans l'analyse des données IRM. J'ai ensuite effectué l'analyse statistique des données et rédigé l'article avec l'aide du Pr Payen. Nora Collomb nous a aidés dans la réalisation des manipulations. L'analyse en microscopie électronique à été réalisée grâce à l'aide de Karin Pernet Gallay et d'Anne Bertrand.

Hypertonic sodium lactate to modulate brain metabolism dysfunction following diffuse traumatic brain injury

Anne MILLET, M.D. [1,2,3]

Adrien CUISINIER, M.D. [1,2,4]

Pierre BOUZAT, M.D., PhD. [1,2,4]

Cécile BATANDIER, Ph.D. [5]

Benjamin LEMASSON, Ph.D. [1,2]

Vasile STUPAR, Ph.D. [1,2]

Karin PERNET-GALLAY, Ph.D. [1,2]

Emmanuel L. BARBIER, Ph.D. [1,2]

Jean François PAYEN, M.D., Ph.D. [1,2,4]

[1] INSERM, U1216, F-38000, Grenoble, France

[2] Univ. Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences, F-38000 Grenoble, France

[3] Pôle Couple Enfant, Hôpital Michallon, CHU Grenoble Alpes, F-38000, Grenoble, France

[4] Pôle Anesthésie Réanimation, Hôpital Michallon, CHU Grenoble Alpes, F-38000, Grenoble, France

[5] INSERM, U1055, Laboratoire de Biologie Fondamentale et Appliquée, Grenoble, F-38000, France

Correspondence: Dr Jean-François Payen, Grenoble Institut des Neurosciences, INSERM U1216/Equipe 5. Université Grenoble Alpes, Site santé de la Tronche, BP 170. Grenoble Cedex 9, 38042 France. Tel 33 4 56 52 05 89. Fax 33 4 56 52 05 98. Email: jfpayen@ujf-grenoble.fr

Running title: Hypertonic sodium lactate and brain trauma

Abstract

Background: Hypertonic sodium lactate (HSL) solution is emerging as a promising option to treat injured brain tissue. However, its exact mechanism of action remains unclear. Using multiparametric MRI-based approaches, we investigated the cerebral metabolic and circulatory effects of a post-traumatic infusion of HSL in a rodent model of diffuse traumatic brain injury (TBI).

Methods: Thirty minutes after trauma (impact-acceleration model), adult male Wistar rats were randomly assigned to receive a 3 h intravenous infusion of either a saline solution (TBI-saline) or hypertonic sodium lactate (TBI-HSL). Two other groups received no trauma insult (sham-saline and sham-HSL). Three series of experiments were conducted up to 4 h (H4) after TBI. The first investigated the effects of HSL on brain oedema using diffusion-weighted MRI to measure apparent diffusion coefficient, and on brain metabolism using *in vivo* localised ^{1}H MR spectroscopy to measure intracellular lactate/creatine ratio (n = 10 rats per group). The respiratory control ratio was then determined at H4 using oxygraphic analysis of extracted mitochondria from brain tissue. Secondly, the effects of HSL on brain oxygenation and perfusion were investigated using a multiparametric quantitative blood oxygenation level–dependent MR approach (n=10 rats per group) to measure tissue oxygen saturation (StO_2) and vessel size index. Finally, mitochondrial ultrastructural changes after treatment were studied (n = 1 rat per group).

Results: Compared with the TBI-saline group, the TBI-HSL and the sham-operated groups had reduced brain oedema ($P<0.05$). Concomitantly, the TBI-HSL group had significantly lower intracellular lactate/creatine ratio, higher mitochondrial respiratory control ratio, improved StO_2 and vessel size index measurements, and reduced morphological mitochondrial disruption in astrocytes and neurons compared with the TBI-saline group (all $P<0.05$).

Conclusion: These findings indicate that post-traumatic administration of HSL can reverse brain oxygenation and metabolism dysfunction after diffuse TBI. HSL has versatile properties that make this agent particularly suitable to reverse brain tissue derangements following brain trauma.

Keywords: Hypertonic solutions, sodium lactate, traumatic brain injury, MRI, mitochondria.

List of abbreviations:

ADC: apparent diffusion coefficient

BOLD: blood oxygenation level–dependent

BSA: bovine serum albumin

^{1}H-MRS: ^{1}H-magnetic resonance spectroscopy

Hb: haemoglobin content

HSL: hypertonic sodium lactate

ICP: intracranial pressure

Lac: intracellular lactate

MABP: mean arterial blood pressure

NAA: N-acetyl-aspartate

RCR: respiratory control ratio

TBI: traumatic brain injury

TCr: total creatine

TE: echo time

TR: repetition time

VSI: vessel size index

Introduction

There has been a growing interest in the exogenous supplementation of lactate through the administration of HSL solution following brain injury (Bouzat and Oddo, 2014). The rationale for using such a solution was based on accumulating evidence of endogenous lactate as a major oxidative substrate utilised by injured brain cells (Berthet, 2009; Gallagher, 2009; Schurr, 1988). It was shown that exogenous lactate anions could also enter injured brain cells to be utilised as an energy source (Chen, 2000; Maran, 1994; Meierhans, 2012). In patients with no evidence of brain ischemia after TBI, HSL was associated with a significant increase in extracellular concentrations of lactate, pyruvate and glucose (Bouzat, 2014). It was suggested that HSL would act as a glucose-sparing substrate through increasing pyruvate availability for the mitochondrial tricarboxylic acid cycle, restoring oxidative metabolism after TBI. Because a failure of mitochondrial respiration was described after TBI (Lifshitz, 2004; Singh, 2006), HSL could ultimately reverse such metabolic dysfunction. This implies that mitochondrial function in injured brain tissue will benefit from such lactate flooding, a hypothesis that remains unexplored (Dienel, 2016). Alternatively, the cerebral effects of HSL may be due to lactate-related vasodilating effects (Alessandri, 2012; Gordon, 2008) and/or hyperosmotic and anti-oedematous effects leading to a reduction in ICP (Bouzat et al., 2014; Ichai, 2009; Ichai, 2013).

In order to clarify the exact role of HSL in brain injury, we used multiple techniques to determine intracellular lactate, brain tissue oxygenation and perfusion, and mitochondrial RCR in a rodent model of diffuse TBI. We hypothesised that exogenous lactate would be utilised by injured brain cells to reverse brain metabolism and oxygenation dysfunction induced by diffuse TBI. This assumption implies versatile effects of HSL on both brain perfusion and mitochondrial respiration.

Materials and Methods

A series of three experiments were conducted on each of four groups of adult male Wistar rats (350-500g). In the first series of experiments, we studied the effect of HSL on combined measurements of brain oedema and brain metabolism after diffuse TBI. We used diffusion-weighted MRI to assess brain oedema prior to TBI, at 2 h (H2) and 4 h (H4) after TBI or equivalent time, thus each rat (n = 10 per group) acted as its own control. Simultaneously, brain metabolism was assessed using *in vivo* localised ^{1}H-MRS. Rats were then sacrificed to measure the RCR of extracted mitochondria from brain tissue using oxygraphic analysis. Rats were randomly assigned to one of four groups: the TBI-saline group received a saline treatment and the TBI-HSL group was treated 30 min post-trauma for 3 h with HSL. Sham-saline and sham-HSL rats received no TBI insult. In the second series of experiments using a similar protocol and four groups of rats, we investigated the effect of HSL on combined measurements of brain perfusion and brain oxygenation. We used multiparametric quantitative BOLD approach to measure brain tissue oxygen saturation (StO_2) (n = 10 per group) and VSI (n = 5 rats per group) prior to TBI and at H2 and H4 after TBI or equivalent time. In the third series of experiments using a similar protocol, we evaluated morphological disruption of mitochondria using electron microscopy at H4 (n = 1 rat per group).

* Experimental protocol

The study design was approved by the local Internal Evaluation Committee for Animal Welfare and Rights. Experiments were performed in accordance with the guidelines of the French Government (licenses 380819 and A3851610008). The experimental protocol was similar to the one described previously (Bouzat, 2013; Millet, 2016). In the animal facilities, rats were maintained within a 12 h light-dark cycle with humidity and temperature controlled

at normal levels, and allowed food and water *ad libitum* (2-4 cage companions). Anaesthesia was induced and maintained using isoflurane (inhaled fraction of 2.0-2.5%) during the study period. After tracheal intubation, rats were mechanically ventilated with 60% air–40% oxygen using a rodent ventilator (SAR-830/P, CWE, Ardmore, PA, USA). Catheters were inserted into the femoral artery and vein for MABP monitoring and drug delivery. Blood gases (PaO_2 and $PaCO_2$), arterial pH and Hb were determined from arterial blood samples of less than 0.1 ml (ABL 510, Radiometer, Copenhagen, Denmark). Rectal temperature was kept at 36±0.5 °C. Criteria for exclusion from the study were values outside the range of the following physiological parameters measured 1 h (H1) after the reference time: MABP < 70 mm Hg, PaO_2 < 100 mm Hg, $PaCO_2$ < 30 mm Hg or > 50 mm Hg, and Hb < 80 g/L.

Injury was induced by dropping a 500 g mass through a vertical cylinder from a height of 1.5 m on to a metallic disc glued to the central area of the skull vault between the coronal and lambdoid sutures, according to the initial description of impact-acceleration model. The reference time (H0) corresponded to the moment of impact (TBI-saline and TBI-SL) or to an equivalent time (sham-operated). Thirty minutes after H0, the rats were randomly allocated to intravenously receive either 0.5 ml/kg/h of an isotonic saline solution or 0.5 ml/kg/h of a solution of 11.2% HSL (Na^+ 2000 mmol/L, lactate 2000 mmol/L, prepared by the Assistance Publique des Hopitaux de Paris, France) during a continuous infusion lasting 3 h. Randomisation was achieved using pieces of paper folded and placed in a receptacle, with each piece of paper recording an animal number. A piece of paper was randomly withdrawn without replacement on the day of each experiment to allocate each animal into a group.

* MRI measurements

In the first series of experiments, MRI was performed before, 2 h (H2) and 4 h (H4) after TBI or an equivalent time in sham-operated groups at 9.4T in a horizontal bore magnet

(Biospec Avance III HD, Bruker Biospin, Ettlingen, Germany). A 72 mm inner diameter quadrature volume coil was used for radio frequency transmission and an actively decoupled four channel array surface coil optimised for rat brain MRI was used for signal detection. A T_2-weighted TurboRARE sequence (TR/TE = 2500 ms/33 ms, voxel size = 117x117x800 µm, 23 slices, total acquisition time of 2 min 40 s) was used to delineate the region of interest. Diffusion-weighted images were acquired using a diffusion-weighted MRI protocol. Five adjacent rostrocaudal slices were acquired using a 2D diffusion-weighted, spin-echo, single-shot echo-planar imaging (TR 2000 ms, TE 20 ms, field of view 25x25 mm, matrix 108x108, 8 averages; voxel size 278x278x800 µm, total acquisition time of 2 min 24 s). This sequence was applied six times, three without diffusion weighting and three times with diffusion weighting (b = 650 $s.mm^{-1}$) in three orthogonal directions, in order to map the ADC (mm^2/s). One region of interest was manually drawn on the T2-weighted images and copied onto the ADC images, including right and left parietal neocortex, and right and left caudoputamen. The change in ADC was measured at H2 (=ADC H2-ADC before TBI) and at H4 (=ADC H4-ADC before TBI).

In vivo ^{1}H-MRS was acquired at the same time points. Spectra were acquired with the short echo time PRESS sequence (Bottomley, 1987), with TE/TR=16.16/2500 ms, 4401 Hz bandwidth, 2048 data points and 256 averages. The total acquisition time was 11 min. The volume of interest was set to 27 mm^3 (3x3x3 mm) and placed in the centre of the left striatum. The PRESS localisation was preceded with the VAPOR water suppression and outer volume suppression modules. Spectra were quantified using the subtract-QUEST procedure (Ratiney, 2005) running under jMRUI package software (Java-based version of the Magnetic Resonance User Interface, http://www.mrui.uab.es/mrui). The value of intracellular NAA and Lac amplitudes was normalised to the sum of creatine and phosphocreatine that is total TCr.

In the second series of experiments, MRI was performed at 7T in a horizontal bore magnet (Bruker Biospec 47/40 USR AV III, Bruker BioSpin, Wissembourg, France). StO_2 maps were obtained using a multiparametric quantitative BOLD approach as we previously described (Christen, 2011; Christen, 2014). Haematocrit was fixed to 0.85 × 42%. The 0.85 factor accounts for the Fåhræus-Lindqvist effect that reduces the haematocrit in small capillaries. Cerebral perfusion was measured using a previously described steady-state approach based on the change in susceptibility after injection of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide (P904, 200 μmol/kg, Guerbet SA, Aulnay-sous-Bois, France) which allows the determination of VSI (Tropres, 2001). The VSI changes (ΔVSI) were calculated at H2 and at H4 by comparison with H0: ΔVSI = (VSI at H2 (or H4) – VSI at H0)/VSI at H0. Additionally, serum concentrations of lactate, sodium, chloride and osmolality were determined at H4, i.e., 1 h after the cessation of infusion.

* Mitochondria extraction and oxygraphic analysis

Once ^{1}H-MRS was completed at H4 (first series of experiments), anaesthetised animals were sacrificed by decapitation and brains were rapidly excised. The procedure was carried out at 4°C. Once removal of cerebellum and meninges, brain tissue was placed in a Potter Elvejhem homogeniser containing MSHE buffer (225mM mannitol, 75 mM sucrose, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, pH 7.40) and crushed at 500 rounds per minute in the presence of BSA (fatty acid free, 0.1%). After ten strokes, the homogenate underwent four successive differential centrifugations. The first one was conducted at 2000 *g* for 4 min to remove cellular debris and nuclei. The supernatant was centrifuged at 12000 *g* for 10 min, carefully removed and the pellet was resuspended in MSHE-BSA buffer and incubated with 0.02% digitonin during 4 min for permeabilising synaptosomes. The pellet was then subjected to two final centrifugations at 12000 *g* for 10 min each and resuspended in buffer isolation. The

protein concentration of the suspension was assessed at the beginning of each procedure using the Bradford technique (Hammond and Kruger, 1988). The yield of mitochondria was set in 0.5 mg/ml suspension buffer for each animal. Once extracted, fresh mitochondria were used within 4 h.

Oxygraphic analysis was then used to assess mitochondrial RCR. The protocol was similar to the one previously described (Millet et al., 2016). We used a Clark-type electrode (StrathKelvin, Scotland) at 37°C in a continuously stirred, sealed thermostatically controlled chamber. Isolated mitochondria (0.5mg/ml) were placed in the chamber containing respiration KET buffer (125 mM KCl, 1 mM EGTA, 20 mM Tris, pH 7.2) in the presence of 5mM phosphate and BSA and tested with different inducers. After equilibration, glutamate-malate (5 mM/2.5 mM) or succinate (5 mM), which are substrates of complexes I and II respectively, were added. Adenosine diphosphate (300µM) was then added to initiate a state-III respiratory rate for 2 min, followed by the addition of oligomycin (1µg/ml) to obtain a non-phosphorylating state for 2 min. The RCR was calculated dividing the state III respiratory rates by non-phosphorylating state rates.

* Electron microscopy

In the third series of experiments using a similar protocol, rats were sacrificed by decapitation at H4 (n = 1 rat per group). Brains were rapidly excised and cortex samples (n = 3 per rat) fixed in 2.5% glutaraldehyde (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4) for 24 h at room temperature. Samples were post-fixed in 1% osmium tetroxide (0.1 M cacodylate, pH 7.2) for 1 h at 4°C, and stained with 1% uranyl acetate (pH 4) in water for 1 h at 4°C and dehydrated through graded alcohol concentrations before being embedded in Epoxy Embedding Medium (Fluka, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Cortex brain ultrathin sections (60 nm-thickness) were stained with 5% uranyl acetate and 0.4% lead citrate before being

observed under a transmission electron microscope at 80 kV (Jeol 1200 EX, JEOL Ltd, Tokyo, Japan). Images were acquired with a digital camera (Veleta, SIS, Olympus, Munster, Germany). The analysis was performed by an examiner blinded to the treatment allocated to each rat. Three cortex samples per rat were analysed. At least 200 mitochondria in astrocytes and at least 200 mitochondria in neurons were studied for each sample. The thickness of mitochondrial cristae (nm) was determined to quantify ultrastructural damages after brain injury (Singh et al., 2006).

* Statistical analysis

Data are expressed as median and interquartile range (25-75th quartiles) unless stated otherwise. The nonparametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were performed for continuous variables (StatView SE program, SAS Institute, Cary, NC, USA). Bonferroni's correction was applied for multiple comparisons where appropriate. Statistical significance was declared when $P< 0.05$.

Results

* HSL reduces post-traumatic brain oedema

In the first series of experiments, 51 rats were anaesthetised and subjected to the experimental protocol. Of these, 11 were excluded due to death prior to the experiment termination (n = 7 in the TBI groups, n = 1 in a sham group) and to the loss of ^{1}H-MRS data (n = 3 in the sham groups). The four groups of 10 rats had no differences in physiological parameters during the experiments (Table 1). The ADC values of the region of interest were significantly lower in the TBI-saline group at H2 compared with the sham-saline group: ΔADC = -29.0 (-81.0; -22.0) mm²/s vs. -16.0 (-26.5; +7.7) mm²/s respectively (P=0.02). At H4, the TBI-saline group had lower ADC values compared with the three other groups: ΔADC = -92.0 (-112.0; -86.0) mm²/s (TBI-saline) vs. -72.5 (-82.7; -49.5) mm²/s (TBI-HSL), -40.5 (-55.0; -33.0) mm²/s (sham-saline) and -50.0 (-67.5; -49.0) mm²/s (sham-HSL) (P<0.05 vs. TBI-saline) (Fig.1).

* HSL modulates post-traumatic brain metabolism dysfunction

Typical ^{1}H-MR spectra from each group of rats are shown in Fig 2. Where compared across the four groups of rats, the Lac/TCr ratio was significantly higher in the TBI-saline group compared with the three other groups at H4: 0.097 (0.079-0.157) vs. 0.049 (0.047-0.098) (TBI-HSL), 0.042 (0.041-0.057) (sham-saline), and 0.040 (0.033-0.052) (sham-HSL) (P<0.05 vs. TBI-saline) (Fig.3A). The NAA/TCr ratio was significantly reduced in the two TBI groups by comparison with sham-saline group at H4 only: 0.227 (0.221-0.235) (TBI-saline) and 0.223 (0.216-0.241) (TBI-HSL) vs. 0.250 (0.233-0.268) (sham-saline) (P<0.05) (Fig.3B). A significant difference in RCR was found between groups for complex I-III-IV (glutamate-malate) and complex II-III-IV (succinate). In the presence of glutamate-malate, TBI-saline rats had a significantly decreased RCR 3.9 (3.7-5.4) vs. 7.3 (6.5-7.7) (TBI-HSL),

6.4 (6.0-10.1) (sham-saline) and 8.2 (4.4-8.8) (sham-HSL) ($P<0.05$ vs. TBI-saline). Similar differences between groups were found in the presence of succinate (Fig.4).

* HSL improves post-traumatic cerebral oxygenation and perfusion

In the second series of experiments, 51 rats were anaesthetised and subjected to the experimental protocol. Of these, 11 were excluded due to death prior to the experiment termination (n = 5 in the TBI groups) and to the loss of MRI data (n = 6 in the TBI and sham groups). The StO_2 obtained at H4 were significantly lower in the TBI-saline group compared with the TBI-HSL, sham-saline and sham-HSL groups: 66% (55-73) vs. 77% (71-79), 75% (70-79), and 77% (75-81), respectively ($P<0.05$ vs. TBI-saline) (Fig. 5A). In addition, brain perfusion as assessed by VSI changes from baseline was markedly higher following HSL infusion in the two HSL groups, i.e., TBI-HSL and sham-HSL, compared with the two saline groups, i.e., TBI-saline and sham-saline (Fig. 5B). At H2, VSI changes were +14% (13-17) and +9% (7-11) vs. +4% (2-5) and +1% (1-2), respectively ($P<0.05$). A similar effect was observed at H4.

In this series of experiments, HSL treated groups (sham and TBI) had significant higher concentrations of serum lactate at H4 compared to the two saline groups (Table 2). Serum sodium, chloride and osmolality were not significantly different between the four groups.

* HSL reduces post-traumatic mitochondrial damage

In ultrastructural mitochondrial analyses (third series of experiments), mitochondrial cristae thickness of astrocytes was larger in the TBI-saline compared with that found with TBI-HSL, sham-saline and sham-HSL groups: 38.4 (31.0-47.5) nm vs. 27.5 (22.5-38.4) nm, 28.8 (23.3-34.4) nm, and 27.2 (23.2-32.2) nm, respectively ($P<0.01$ vs. TBI-saline) (Fig.6).

Similar findings were obtained in neurons: 16.9 (14.7-19.4) nm vs. 12.9 (11.2-15.7) nm, 11.5 (9.6-13.1) nm, and 13.1 (11.3-15.0) nm, respectively ($P<0.01$ vs. TBI-saline).

Discussion

The results of our study show that a 3 h HSL infusion can reverse brain metabolism and oxygenation dysfunction induced by diffuse TBI. Specifically, the TBI-treated group with HSL had less intracellular brain lactate accumulation, higher mitochondrial respiration and less ultrastructural mitochondria damage, together with attenuated brain oedema and improved brain oxygenation and perfusion, compared with the TBI-saline group. These findings provide information about the versatile properties of HSL after brain injury and support the rationale of using HSL to improve brain metabolism after TBI.

Alterations in brain tissue metabolism occur during the initial phase post-TBI in response to a variety of biochemical signals, e.g., excitotoxicity, alteration in calcium homeostasis, oxidative stress, inflammation and mitochondrial dysfunction (Bergsneider, 1997; Vespa, 2005; Yoshino, 1991). Increased levels of brain extracellular lactate were found in TBI patients despite well-preserved regional blood flow and brain tissue oxygen tension, suggesting a stimulation of anaerobic glycolysis due to an inefficiency of mitochondrial oxidative metabolism (Sala, 2013; Zauner, 1997). A lactate/pyruvate ratio greater than 25 has been viewed as arising from high glycolytic activity indicative of mitochondrial dysfunction (Timofeev, 2011). Experimental studies have shown morphological and functional post-injury abnormalities suggesting failure in mitochondrial respiration (Singh et al., 2006), with a decreased aerobic production of ATP and anaerobic metabolism without evidence of brain ischemia (Lifshitz et al., 2004; Singh, 2013). Post-traumatic measurements of RCR in mitochondria showed a marked impairment, with subsequent decreased ATP production (Singh et al., 2006; Verweij, 2000). Our lab has recently shown that TBI-saline-treated rats had higher intra-mitochondrial calcium content and reduced calcium-retention capacity measurements 2 h after the impact compared with sham-operated rats along with more ultrastructural damage in mitochondria (Millet et al., 2016). Using *in vivo* ^{1}H-MRS

measurements, intracellular brain lactate accumulation was found as a marker of metabolic impairment in models of localised ischaemia and trauma (Casey, 2008; Payen, 1996). In the present study, our TBI-saline group had greater intracellular brain lactate accumulation compared with the other groups. Collectively, these findings confirm that impairment in mitochondrial function and structure exists after diffuse TBI resulting in a stimulation of anaerobic glycolysis and/or inability to utilise produced lactate.

Our study shows, however, that these oxidative metabolic derangements could be reversible as HSL administration resulted in improved RCR measurements and Lac/TCr ratio, and reduced mitochondrial damages as early as 4h post-injury. Exogenous lactate administration was found to improve mitochondrial oxidative respiration in models of injured brain cells (Levasseur, 2006; Schurr and Payne, 2007) while measurements of cerebral ATP concentrations led to conflicting results (Holloway, 2007; Prieto, 2011). As a possible surrogate marker, extracellular concentrations of lactate, pyruvate and glucose were increased during HSL infusion in TBI patients (Bouzat et al., 2014). The significance of such extracellular lactate elevation after TBI remained unclear. It has been associated with non-ischaemic glycolysis (Sala et al., 2013) and poor outcome (Timofeev et al., 2011). Alternatively, it may reflect the inability of injured brain cells to utilise exogenous lactate. Because the interpretation of extracellular glucose and lactate changes observed with microdialysate assays is not straightforward (Dienel et al., 2016), *in vivo* ^{1}H-MRS is needed to properly evaluate metabolic effects of HSL administration after TBI. Considering that TCr concentration did not change between the two TBI groups of animals, the marked reduction in intracellular lactate concentration in the TBI-HSL group indicate that exogenous lactate was undoubtedly utilised compared with the TBI-saline. If post-traumatic mitochondrial dysfunction had inhibited lactate oxidation, intracellular lactate concentration would have been unchanged or worsened with HSL administration. Added to the results obtained with

RCR and histological experiments, the present study provides evidence that dysfunction of brain mitochondrial metabolism was corrected following HSL treatment in TBI rats.

Due to its high sodium concentration (2000 mmol/l), HSL infusion created an osmotic gradient that might explain the reduction in brain oedema seen in the TBI-HSL group, as measured with diffusion-weighted MRI. These findings confirm previous effects on ICP following HSL administration in TBI patients that indirectly suggested an anti-oedematous action of this compound (Bouzat et al., 2014; Ichai et al., 2009; Ichai et al., 2013). Moreover, this anti-oedematous effect could reduce perivascular swelling located during the process of the endfeet of astrocytes surrounding microvessels, which impairs post-traumatic brain tissue oxygenation according to our previous experimental studies (Bouzat et al., 2013; Schilte, 2015). In these studies, the administration of two anti-oedematous agents, erythropoietin and mannitol, reversed brain oedema and improved brain tissue oxygenation. Infusion of hyperosmotic sodium lactate for 24 h significantly lowered ICP and improved cerebral blood flow in a model of focal TBI (Shackford, 1992). In line with these studies, we found that brain tissue oxygenation (StO_2) and perfusion (VSI) were significantly improved with post-traumatic HSL infusion. Because VSI was markedly increased in sham-HSL compared to sham saline, a direct vasodilating effect of HSL on cerebral microcirculation can be considered in accordance with the role of lactate to induce cerebral vasodilatation when oxygen availability is reduced (Alessandri et al., 2012; Gordon et al., 2008). Collectively, these findings suggest that both hyperosmotic and vasodilating properties of HSL may facilitate the diffusion of oxygen for mitochondrial respiration.

Our study has several limitations. Firstly, brain oedema and brain metabolism were assessed up to 4 h after HSL treatment. Although MR experiments at 2 h and 4 h provided consistent results, we did not determine whether the effects of HSL could be sustained for several hours after trauma. Secondly, we could not assess whether this improvement of brain

mitochondrial metabolism would result in better neurocognitive performance, as previously found with HSL (Holloway et al., 2007; Rice, 2002). Finally, HSL was given over a 3 h continuous infusion as done elsewhere (Bouzat et al., 2014), at a concentration of 15-20 μmol/kg/min infused lactate. Considering the possible utilisation of infused lactate by peripheral tissues, further investigations are required to determine the most effective doses for HSL infusion on brain metabolism after TBI.

In conclusion, diffuse TBI produces brain oedema, microcirculatory derangements and oxidative metabolic dysfunction. Post-injury treatment with a 3 h HSL infusion restored TBI-induced mitochondrial dysfunction together with improved brain oxygenation and perfusion. These findings add to the versatile properties of HSL as a neuroprotective agent and may reinforce the rationale for targeting the brain oxidative dysfunction in TBI studies.

Acknowledgments

The authors wish to thank Anne Bertrand for her help in electron microscopy analysis.

Funding

This study was conducted at the INSERM U1216/Grenoble Institut des Neurosciences and was supported in part by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Ministère de l'Education, de la Recherche et de la Technologie, and Fondation des Gueules Cassées. Brain MRI was performed at the Grenoble MRI Facility (IRMaGe).

Declaration of interest

Anne Millet, Adrien Cuisinier, Pierre Bouzat, Benjamin Lemasson, Vasile Stupar, Cecile Batandier, Karin Pernet Gallay, Emmanuel L. Barbier, and Jean François Payen have no competing financial interest to declare.

References

Alessandri B, Schwandt E, Kamada Y, Nagata M, Heimann A, Kempski O. The neuroprotective effect of lactate is not due to improved glutamate uptake after controlled cortical impact in rats. J Neurotrauma 2012; 29: 2181-91.

Bergsneider M, Hovda DA, Shalmon E, Kelly DF, Vespa PM, Martin NA*, et al.* Cerebral hyperglycolysis following severe traumatic brain injury in humans: a positron emission tomography study. J Neurosurg 1997; 86: 241-51.

Berthet C, Lei H, Thevenet J, Gruetter R, Magistretti PJ, Hirt L. Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 2009; 29: 1780-9.

Bottomley PA. Spatial localization in NMR spectroscopy in vivo. Ann N Y Acad Sci 1987; 508: 333-48.

Bouzat P, Oddo M. Lactate and the injured brain: friend or foe? Curr Opin Crit Care 2014; 20: 133-40.

Bouzat P, Millet A, Boue Y, Pernet-Gallay K, Trouve-Buisson T, Gaide-Chevronnay L*, et al.* Changes in brain tissue oxygenation after treatment of diffuse traumatic brain injury by erythropoietin. Crit Care Med 2013; 41: 1316-24.

Bouzat P, Sala N, Suys T, Zerlauth JB, Marques-Vidal P, Feihl F*, et al.* Cerebral metabolic effects of exogenous lactate supplementation on the injured human brain. Intensive Care Med 2014; 40: 412-21.

Casey PA, McKenna MC, Fiskum G, Saraswati M, Robertson CL. Early and sustained alterations in cerebral metabolism after traumatic brain injury in immature rats. J Neurotrauma 2008; 25: 603-14.

Chen T, Qian YZ, Rice A, Zhu JP, Di X, Bullock R. Brain lactate uptake increases at the site of impact after traumatic brain injury. Brain Res 2000; 861: 281-7.

Christen T, Lemasson B, Pannetier N, Farion R, Segebarth C, Remy C*, et al.* Evaluation of a quantitative blood oxygenation level-dependent (qBOLD) approach to map local blood oxygen saturation. NMR Biomed 2011; 24: 393-403.

Christen T, Bouzat P, Pannetier N, Coquery N, Moisan A, Lemasson B*, et al.* Tissue oxygen saturation mapping with magnetic resonance imaging. J Cereb Blood Flow Metab 2014; 34: 1550-7.

Dienel GA, Rothman DL, Nordstrom CH. Microdialysate concentration changes do not provide sufficient information to evaluate metabolic effects of lactate supplementation in brain-injured patients. J Cereb Blood Flow Metab 2016; 36: 1844-1864.

Gallagher CN, Carpenter KL, Grice P, Howe DJ, Mason A, Timofeev I*, et al.* The human brain utilizes lactate via the tricarboxylic acid cycle: a 13C-labelled microdialysis and high-resolution nuclear magnetic resonance study. Brain 2009; 132: 2839-49.

Gordon GR, Choi HB, Rungta RL, Ellis-Davies GC, MacVicar BA. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. Nature 2008; 456: 745-9.

Hammond JB, Kruger NJ. The bradford method for protein quantitation. Methods Mol Biol 1988; 3: 25-32.

Holloway R, Zhou Z, Harvey HB, Levasseur JE, Rice AC, Sun D*, et al.* Effect of lactate therapy upon cognitive deficits after traumatic brain injury in the rat. Acta Neurochir (Wien) 2007; 149: 919-27.

Ichai C, Armando G, Orban JC, Berthier F, Rami L, Samat-Long C*, et al.* Sodium lactate versus mannitol in the treatment of intracranial hypertensive episodes in severe traumatic brain-injured patients. Intensive Care Med 2009; 35: 471-9.

Ichai C, Payen JF, Orban JC, Quintard H, Roth H, Legrand R*, et al.* Half-molar sodium lactate infusion to prevent intracranial hypertensive episodes in severe traumatic brain injured patients: a randomized controlled trial. Intensive Care Med 2013; 39: 1413-22.

Levasseur JE, Alessandri B, Reinert M, Clausen T, Zhou Z, Altememi N*, et al.* Lactate, not glucose, up-regulates mitochondrial oxygen consumption both in sham and lateral fluid percussed rat brains. Neurosurgery 2006; 59: 1122-30.

Lifshitz J, Sullivan PG, Hovda DA, Wieloch T, McIntosh TK. Mitochondrial damage and dysfunction in traumatic brain injury. Mitochondrion 2004; 4: 705-13.

Maran A, Cranston I, Lomas J, Macdonald I, Amiel SA. Protection by lactate of cerebral function during hypoglycaemia. Lancet 1994; 343: 16-20.

Meierhans R, Brandi G, Fasshauer M, Sommerfeld J, Schupbach R, Bechir M*, et al.* Arterial lactate above 2 mM is associated with increased brain lactate and decreased brain glucose in patients with severe traumatic brain injury. Minerva Anestesiol 2012; 78: 185-93.

Millet A, Bouzat P, Trouve-Buisson T, Batandier C, Pernet-Gallay K, Gaide-Chevronnay L*, et al.* Erythropoietin and Its Derivates Modulate Mitochondrial Dysfunction after Diffuse Traumatic Brain Injury. J Neurotrauma 2016; 33: 1625-33.

Payen JF, LeBars E, Wuyam B, Tropini B, Pepin JL, Levy P*, et al.* Lactate accumulation during moderate hypoxic hypoxia in neocortical rat brain. J Cereb Blood Flow Metab 1996; 16: 1345-52.

Prieto R, Tavazzi B, Taya K, Barrios L, Amorini AM, Di Pietro V*, et al.* Brain energy depletion in a rodent model of diffuse traumatic brain injury is not prevented with administration of sodium lactate. Brain Res 2011; 1404: 39-49.

Ratiney H, Sdika M, Coenradie Y, Cavassila S, van Ormondt D, Graveron-Demilly D. Time-domain semi-parametric estimation based on a metabolite basis set. NMR Biomed 2005; 18: 1-13.

Rice AC, Zsoldos R, Chen T, Wilson MS, Alessandri B, Hamm RJ*, et al.* Lactate administration attenuates cognitive deficits following traumatic brain injury. Brain Res 2002; 928: 156-9.

Sala N, Suys T, Zerlauth JB, Bouzat P, Messerer M, Bloch J*, et al.* Cerebral extracellular lactate increase is predominantly nonischemic in patients with severe traumatic brain injury. J Cereb Blood Flow Metab 2013; 33: 1815-22.

Schilte C, Bouzat P, Millet A, Boucheix P, Pernet-Gallay K, Lemasson B*, et al.* Mannitol Improves Brain Tissue Oxygenation in a Model of Diffuse Traumatic Brain Injury. Crit Care Med 2015; 43: 2212-8.

Schurr A, Payne RS. Lactate, not pyruvate, is neuronal aerobic glycolysis end product: an in vitro electrophysiological study. Neuroscience 2007; 147: 613-9.

Schurr A, West CA, Rigor BM. Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation. Science 1988; 240: 1326-8.

Shackford SR, Zhuang J, Schmoker J. Intravenous fluid tonicity: effect on intracranial pressure, cerebral blood flow, and cerebral oxygen delivery in focal brain injury. J Neurosurg 1992; 76: 91-8.

Singh IN, Sullivan PG, Deng Y, Mbye LH, Hall ED. Time course of post-traumatic mitochondrial oxidative damage and dysfunction in a mouse model of focal traumatic brain injury: implications for neuroprotective therapy. J Cereb Blood Flow Metab 2006; 26: 1407-18.

Singh IN, Gilmer LK, Miller DM, Cebak JE, Wang JA, Hall ED. Phenelzine mitochondrial functional preservation and neuroprotection after traumatic brain injury related to scavenging of the lipid peroxidation-derived aldehyde 4-hydroxy-2-nonenal. J Cereb Blood Flow Metab 2013; 33: 593-9.

Timofeev I, Carpenter KL, Nortje J, Al-Rawi PG, O'Connell MT, Czosnyka M*, et al.* Cerebral extracellular chemistry and outcome following traumatic brain injury: a microdialysis study of 223 patients. Brain 2011; 134: 484-94.

Tropres I, Grimault S, Vaeth A, Grillon E, Julien C, Payen JF*, et al.* Vessel size imaging. Magn Reson Med 2001; 45: 397-408.

Verweij BH, Muizelaar JP, Vinas FC, Peterson PL, Xiong Y, Lee CP. Impaired cerebral mitochondrial function after traumatic brain injury in humans. J Neurosurg 2000; 93: 815-20.

Vespa P, Bergsneider M, Hattori N, Wu HM, Huang SC, Martin NA*, et al.* Metabolic crisis without brain ischemia is common after traumatic brain injury: a combined microdialysis and positron emission tomography study. J Cereb Blood Flow Metab 2005; 25: 763-74.

Yoshino A, Hovda DA, Kawamata T, Katayama Y, Becker DP. Dynamic changes in local cerebral glucose utilization following cerebral conclusion in rats: evidence of a hyper- and subsequent hypometabolic state. Brain Res 1991; 561: 106-19.

Zauner A, Doppenberg E, Woodward JJ, Allen C, Jebraili S, Young HF*, et al.* Multiparametric continuous monitoring of brain metabolism and substrate delivery in neurosurgical patients. Neurol Res 1997; 19: 265-73.

Table 1: Physiological data from the four groups of rats in the first series of experiments (n = 10 rats per group): Sham-saline, Sham-HSL, TBI-saline and TBI-HSL. Data were collected 1 h after the TBI impact (or equivalent time in sham-operated rats). Data are expressed as median and 25-75th quartiles.

Variables	Sham-saline	Sham-HSL	TBI-saline	TBI-HSL
Weight (g)	420 (390-465)	450 (420-500)	450 (420-500)	450 (400-497)
MABP (mm Hg)	82 (80-85)	85 (78-92)	73 (70-73)	90 (81-94)
PaO_2 (mm Hg)	118 (110-120)	117 (111-120)	118 (113-120)	110 (107-110)
$PaCO_2$ (mm Hg)	36 (33-40)	34 (32-36)	35 (34-42)	40 (37-42)
Arterial pH	7.37 (7.36-7.39)	7.35 (7.31-7.41)	7.33 (7.31-7.34)	7.37 (7.32-7.41)
Temperature (°C)	35.7 (35.0-36.0)	36.0 (35.2-36.0)	35.5 (35.0-36.0)	35.0 (35.0-36.0)
Hb (g/L)	135 (120-146)	130 (121-141)	135 (129-143)	130 (115-134)

HSL, hypertonic serum lactate; TBI, traumatic brain injury; MABP, mean arterial blood pressure; Hb, haemoglobin content

Table 2. Serum concentrations of lactate, sodium, chloride and measured osmolarity from the four groups of rats in the second series of experiments (n = 10 rats per group): Sham-saline, Sham-HSL, TBI-saline and TBI-HSL. Data were collected at H4, i.e., 1 h after the cessation of infusion. Data are expressed as median and 25-75th quartiles. * P<0.05 vs. TBI-saline. # P<0.05 vs. sham-saline.

Variables	Sham-saline	Sham-HSL	TBI-saline	TBI-HSL
Lactate (mmol/L)	3.4 (3.3-4.6)	6.0 (5.2-6.9)*#	3.5 (3.3-4.4)	8.0 (7.4-9.6)*#
Sodium (mmol/L)	144 (143-144)	131 (115-138)	141 (140-143)	147 (144-147)
Chloride (mmol/L)	107 (106-107)	105 (101-106)	104 (101-106)	104 (103-110)
Osmolality (mOsm/kg)	312 (311-313)	312 (311-312)	309 (309-312)	323 (314-331)

HSL, hypertonic serum lactate; TBI, traumatic brain injury

Fig.1. Changes in averaged apparent diffusion coefficient values (ADC) of water in grey matter (included neocortex and caudoputamen) between baseline (H0) and 2 h (ΔH2) and 4 h (ΔH4) after TBI (or equivalent time in sham-operated) in four groups of rats (n = 10 per group): Sham-saline, sham-HSL, TBI-saline and TBI-HSL. Boxplots show 25-75th percentile range (box) and 10th and 90th percentiles (whiskers). HSL, hypertonic sodium lactate. * P<0.05 vs. TBI-saline

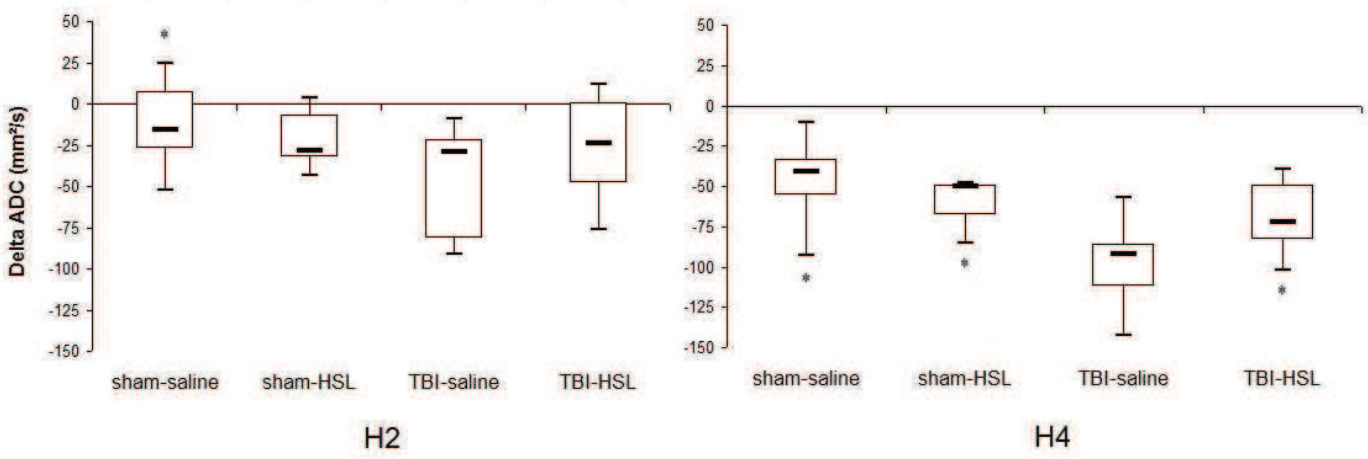


Fig 2. Typical ^{1}H-MR spectra of two rats: TBI-saline (A) and TBI-HSL (B). The lactate peak is higher in the TBI-saline rat. NAA, N-Acetyl-Aspartate; TCr, total creatine (creatine + phosphocreatine); Cho, Choline.

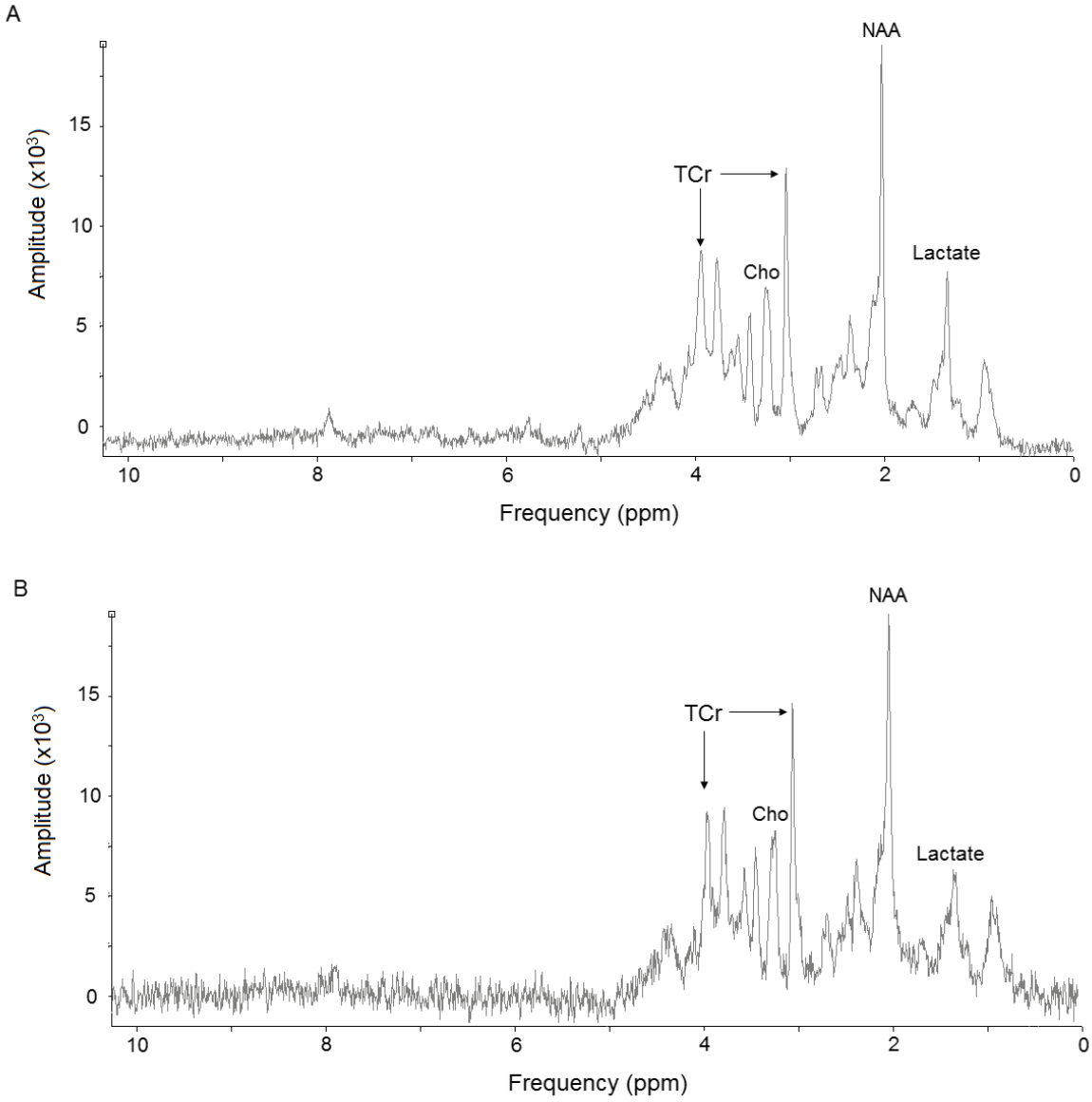


Fig.3. [1]H-MR analysis of lactate/total creatine (A) and N-acetyl-aspartate (NAA)/total creatine (B) at H2 and H4 after TBI (or equivalent time in sham-operated) in the four groups of rats. Total creatine is the sum of creatine and phosphocreatine. Boxplots show 25-75th percentile range (box) and 10th and 90th percentiles (whiskers). HSL, hypertonic sodium lactate. * P<0.05 vs. TBI-saline, £ P<0.05 vs. TBI-HSL.

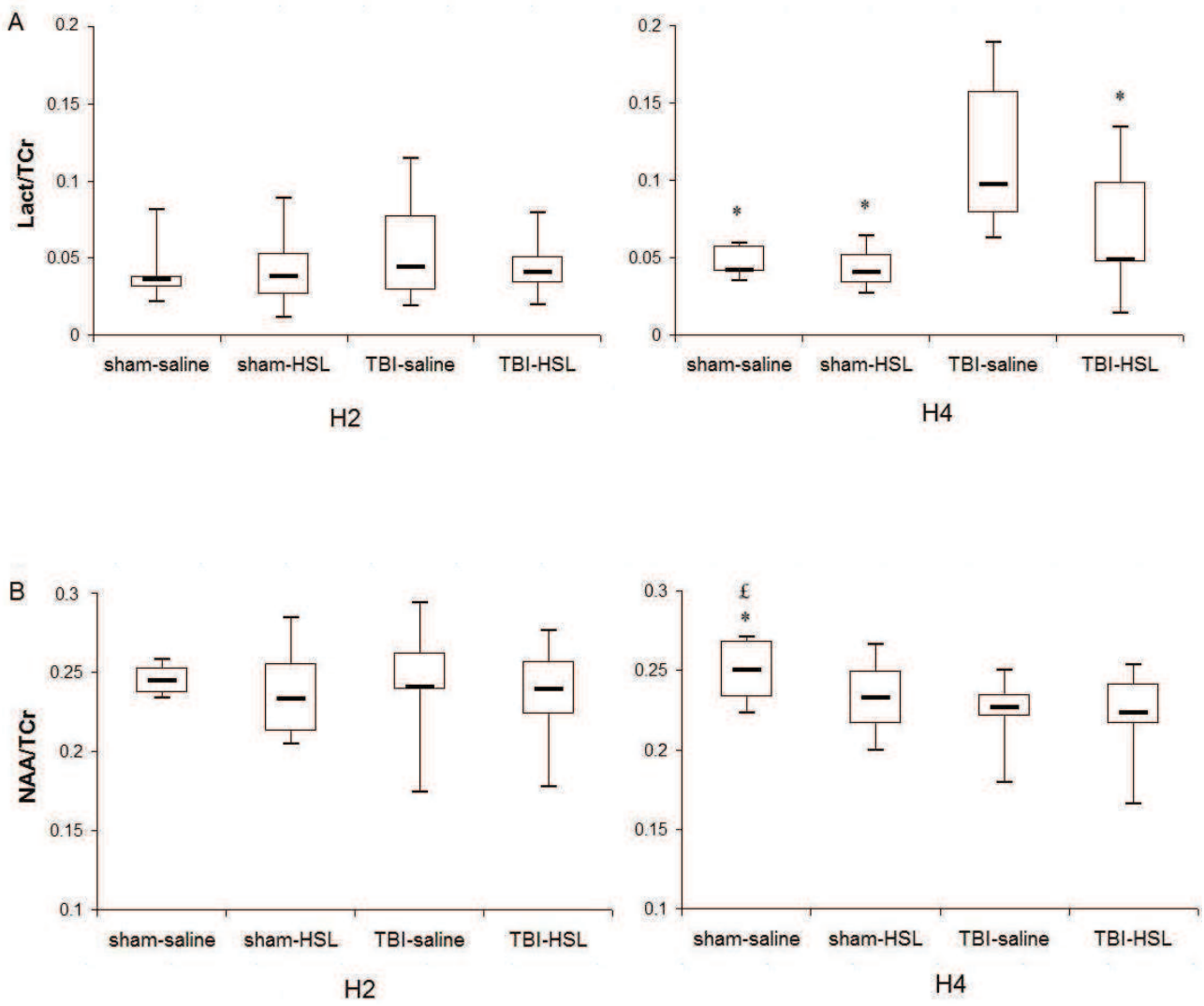


Fig.4. Respiratory control ratio (RCR) for complex I-III-IV (glutamate-malate) and II-III-IV (succinate) of the four groups of rats (n = 10 per group): Sham-saline, sham-HSL, TBI-saline and TBI-HSL. Boxplots show 25-75th percentile range (box) and 10th and 90th percentiles (whiskers). HSL, hypertonic sodium lactate. * P<0.05 vs. TBI-saline.

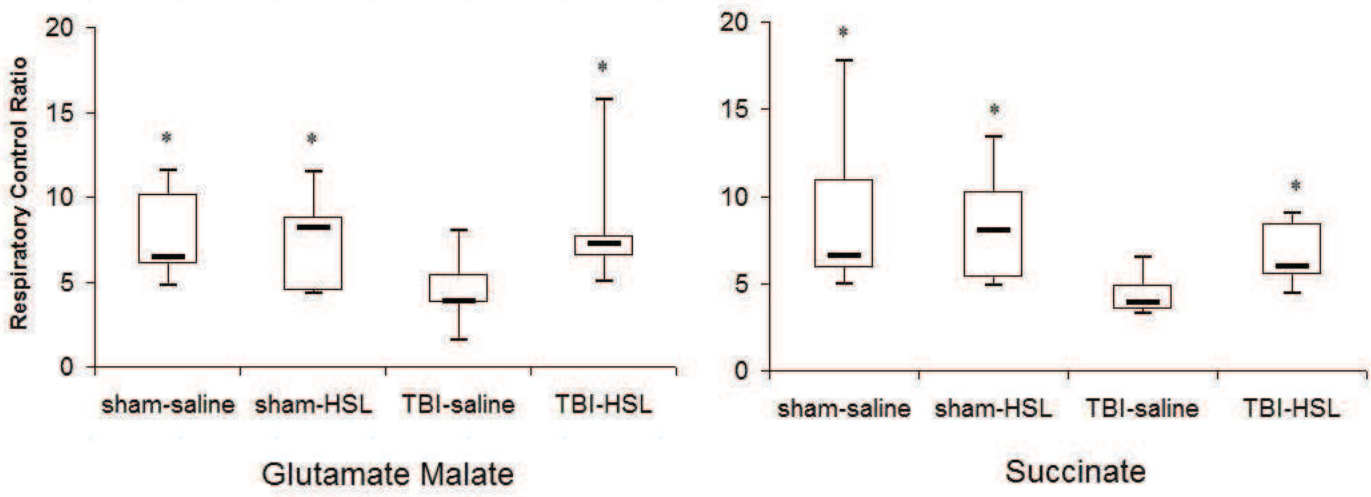
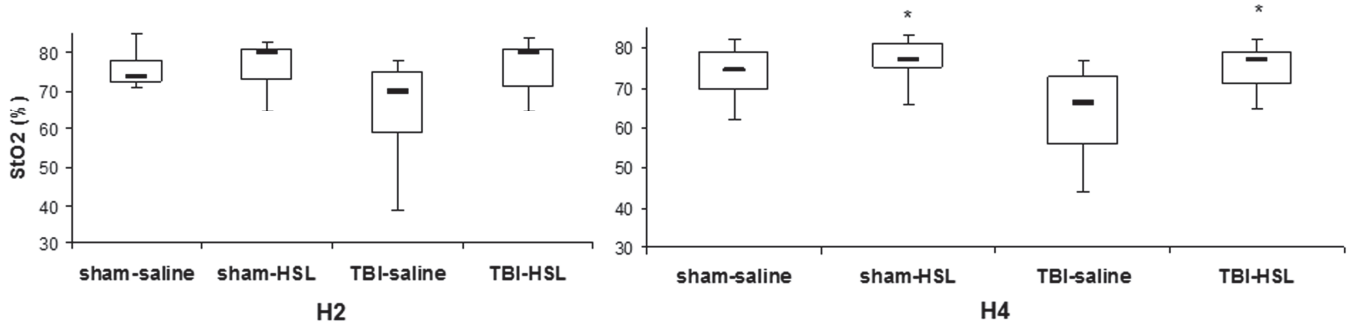


Fig. 5. A. Averaged StO_2 values at H2 and at H4 after TBI (or equivalent time in sham-operated) in four groups of rats (n = 10 per group): Sham-saline, sham-HSL, TBI-saline and TBI-HSL. B. Changes in vessel size imaging (ΔVSI) values between baseline and 2 h (H2 and 4 h (H4) after TBI (or equivalent time in sham-operated) in the four groups of rats. Boxplots show 25-75th percentile range (box) and 10th and 90th percentiles (whiskers). HSL, hypertonic sodium lactate. * P<0.05 vs. TBI-saline. £ P<0.05 vs. TBI-HSL

A



B

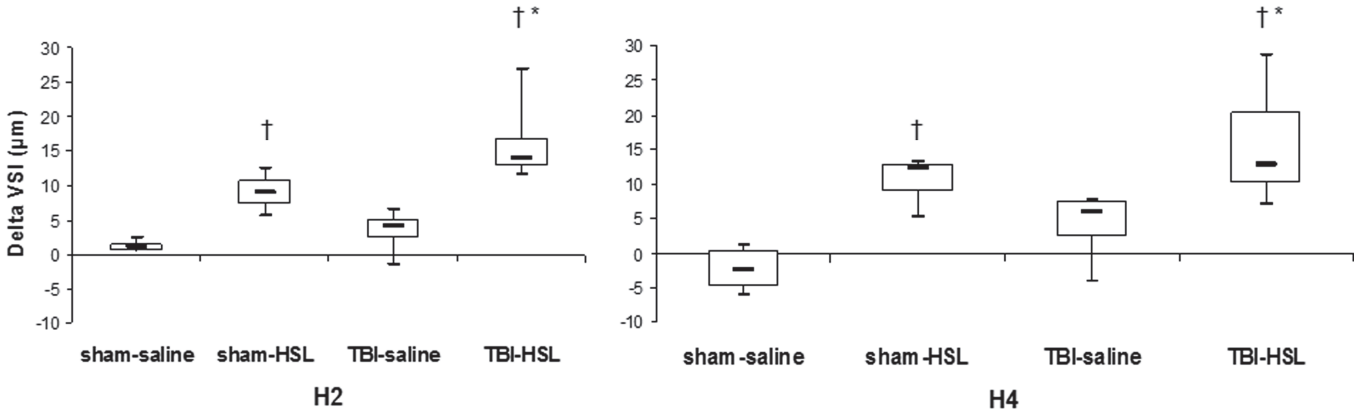
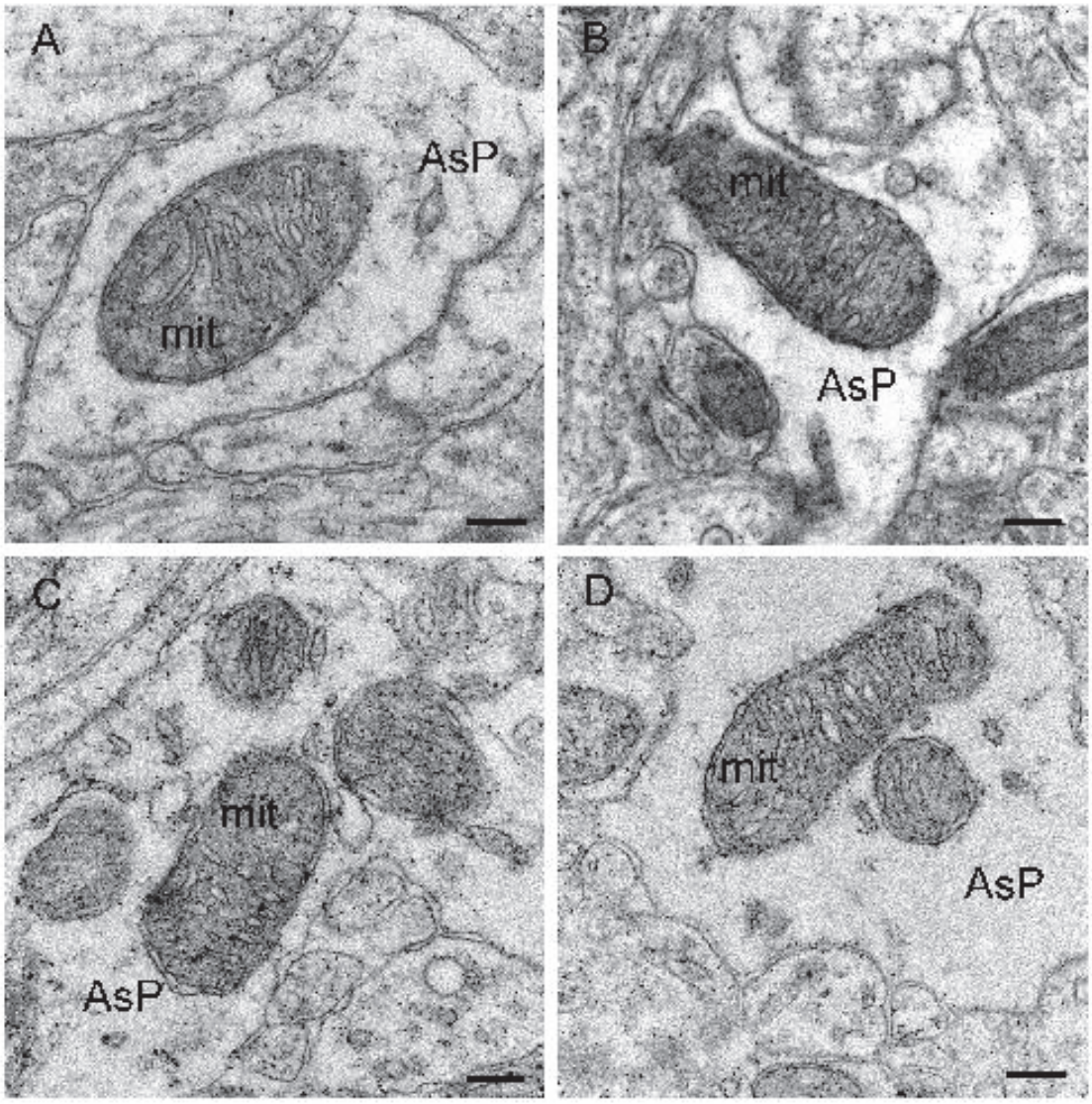


Fig. 6. Ultrastructural analysis of mitochondria of cortical tissue in sham-operated (A), sham-HSL (B), TBI-saline (C) and TBI-HSL rats (D) at 4 h post-trauma (or equivalent in sham-operated). In TBI saline rat (C), a remodelling of the morphology of mitochondria is observed in astrocytes and neurons compared with other groups. Reduced mitochondrial damage is observed with HSL (D). HSL, hypertonic sodium lactate; mit, mitochondria; AsP, astrocytic processes. Scale bar (at the bottom of each image) is 2μm.



d. Résultats

Nos travaux semblent actuellement montrer un effet bénéfique du lactate de sodium sur l'oxygénation cérébrale post traumatique avec réduction de l'œdème cérébral associé à un effet vasodilatateur. Nous avons aussi observé une dysfonction mitochondriale morphologique et fonctionnelle post traumatique, améliorée par la perfusion de lactate. Ces résultats sont concordants avec certains résultats de la littérature (Levasseur, Alessandri et al. 2006, Schurr and Payne 2007). Concernant les mécanismes impliqués, le lactate de sodium en diminuant l'œdème cérébral post TC faciliterait la diffusion de l'O2 aux tissus cérébraux pour la phosphorylation oxydative avec également un effet vasodilatateur favorisant la PPC. Cette amélioration de la fonction mitochondriale entrainerait une meilleure utilisation des substrats énergétiques d'où une diminution de lactate intracellulaire en SRM après administration de lactate de sodium exogène hypertonique.

La dysfonction énergétique survenant en post-traumatique reflète l'augmentation des besoins énergétiques pour restaurer l'homéostasie cellulaire perturbée par différents phénomènes (Fiskum 2000). Le lactate de sodium hypertonique a montré des effets bénéfiques sur la PIC et la PPC, le métabolisme cérébral et le devenir neurologique des patients. Ces effets passeraient pas le biais d'un effet anti œdémateux (Ichai, Armando et al. 2009, Ichai, Payen et al. 2013, Bouzat, Magistretti et al. 2014, Bouzat and Oddo 2014, Bouzat, Sala et al. 2014) mais aussi via l'obtention d'une balance chlorée négative d'où un effet plus perenne dans le temps (Ichai, Payen et al. 2013). Des effets vasodilatateurs, comme dans notre étude, ont également été décrits et d'amélioration du métabolisme cérébral par le biais d'une conversion du lactate en pyruvate à la suite de l'hyperglycolyse post traumatique (Gordon, Choi et al. 2008, Alessandri, Schwandt et al. 2012). Cependant, beaucoup de ces études malgré une étude de l'oxygénation cérébrale n'ont pas évalué la fonction mitochondriale souvent altérée et l'élévation extracellulaire du pyruvate, du glucose et du lactate post TC pourrait être liée à un dysfonctionnement mitochondrial et donc aboutir à la non utilisation de ce lactate exogène, néfaste (Dienel, Rothman et al. 2016). L'analyse de la chaine respiratoire en oxygraphie et des métabolites intracellulaires en SRM dans notre étude, nous permet ainsi de conclure que l'amélioration du métabolisme cérébral observée est probablement médiée par une chaine respiratoire plus fonctionnelle après administration de lactate de sodium.

e. Conclusion

Nous avons ainsi observé que le lactate de sodium modulait la crise métabolique et la dysfonction mitochondriale post traumatiques. Ceci impliquerait des effets anti œdémateux et vasodilatateur, améliorant l'oxygénation cérébrale et donc la diffusion en oxygène pour les tissus cérébraux et notamment pour la phosphorylation oxydative mitochondriale.

IV. Perspectives

L'objectif de notre travail a été d'évaluer les effets de différentes thérapeutiques sur l'œdème cérébral, l'oxygénation cérébrale, la dysfonction mitochondriale et les troubles du métabolisme cérébral qui surviennent à la suite d'un TC diffus expérimental chez le rat dans un modèle d'impact accélération. Nous avons choisi d'étudier successivement l'érythropoïétine recombinante humaine, l'érythropoïétine carbamylée, dérivé sans fonction hématopoiétique, le mannitol et le lactate de sodium molaire.

L'hypoxie tissulaire post traumatique fait suite à des troubles ischémiques macrocirculatoires (modification du DSC) et/ou des troubles microcirculatoires (modification de la diffusion de l'oxygène aux tissus lésés) en lien avec un œdème cérébral post traumatique. Une approche métabolique conditionne également l'oxygénation tissulaire. Cette hypoxie aggrave la dysfonction mitochondriale post traumatique en modifiant les conditions normales de la phosphorylation oxydative. De plus, une crise métabolique survient en post traumatique avec hyperglycolyse et élévation de lactate endogène visant à contrebalancer la neuroglucopénie cérébrale. En cas de dysfonction mitochondriale, ce lactate ne peut être utilisé dans le cycle de Krebs. C'est pourquoi les thérapeutiques qui améliorent la biodisponibilité des substrats pour la chaine respiratoire ou l'hypoxie cérébrale post traumatique permettent d'améliorer les troubles métaboliques post TC notamment par une modulation de la dysfonction mitochondriale. Cet effet bénéfique sur l'hypoxie cérébrale peut passer via un effet anti oedémateux améliorant la micro/macrocirculation, d'amélioration du DSC par vasodilatation ou d'amélioration de la capacité des tissus à extraire l'oxygène, l'OEF. L'OEF, en plus d'être améliorée par une réduction des troubles de la diffusion en O2, est optimisée par une baisse de l'apoptose cellulaire et/ou une restauration d'une fonctionnalité correcte de la chaine respiratoire.

Ainsi, les différentes thérapeutiques testées, par le biais d'un effet bénéfique sur l'œdème cérébral permettent d'améliorer l'hypoxie tissulaire post TC. Les effets de l'Epo et de ses dérivés ainsi que du lactate de sodium conduisent également à

une amélioration de la dysfonction mitochondriale post traumatique par le biais soit d'une baisse de l'apoptose soit par une amélioration de la fonctionnalité de la chaine respiratoire, améliorant ainsi la capacité d'extraction en O2 tissulaire. L'amélioration de l'hypoxie tissulaire cérébrale post traumatique permet ainsi d'améliorer l'inadéquation entre les besoins en O2 et les apports aux tissus permettant ainsi un meilleur fonctionnement de la phosphorylation oxydative et donc de la production d'énergie pour le cerveau lésé. De même, le lactate pourrait jouer un rôle complémentaire de substrat énergétique alternatif en conditions de neuroglucopénie post TC, améliorant encore plus les conditions de fonctionnement de la chaine respiratoire. Ces effets prometteurs concordent avec les résultats cliniques retrouvés pour ces différentes molécules en recherche clinique.

Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes en termes de recherche clinique et expérimentale. En effet, à une volonté clinique d'obtenir constamment le meilleur DSC adapté à chaque patient (basé sur des principes de neuroréanimation de type surveillance PPC, PIC, DTC), s'ajoute actuellement la volonté d'obtenir une oxygénation cérébrale post traumatique optimale. Tout ceci afin de limiter les lésions secondaires qui surviennnent en dehors de tout évènement ischémique. C'est pourquoi un monitorage continu de cette oxygénation cérébrale est capital chez ces patients cérébrolésés. Actuellement le système faisant référence est la mesure de la PtiO2 en pratique clinique. Il fait l'objet d'une étude randomisée multicentrique Oxy-TC (NCT02754063) dont le CHU de Grenoble est l'investigateur principal (Pr Jean François Payen). L'objectif principal est basé sur la comparaison de la taille du volume lésionnel mesuré en IRM de tenseur de diffusion entre J6-10 post TC entre 2 groupes de traitement : PPC/PIC versus PPC/PIC/PtiO2. Cette étude est actuellement en cours et devrait inclure 300 patients.

Deuxièmement, la compréhension des différents mécanismes d'action des thérapeutiques est intéressante car elle permet de mieux cerner leur application clinique future : délai, voie d'administration, possible effets secondaires… L'érythropoïétine et le lactate de sodium sont des molécules ayant des propriétés multiples. L'érythropoïétine possède des effets anti oedémateux et donc anti hypoxique, anti apoptotique et d'autres décrits dans la littérature. Le lactate de sodium possède des effets antioedémateux du fait de son caractère hypertonique et une action vasodilatatrice, des effets bénéfiques sur la balance chlorée et enfin sur la dysfonction mitochondriale fonctionnelle post traumatique. Nos études par les

mesures de la fonctionnalité de la chaine respiratoire et par les mesures en spectroscopie permettent d'affirmer que que le lactate en tant que substrat a été utilisé par une chaine respiratoire plus fonctionnelle chez les rats pré traités. Ces effets conduisent à améliorer la bioénergétique cellulaire par un meilleur apport de substrats énergétique et d'oxygène aux tissus lésés et donc à améliorer le pronostic neurologique des patients.

Une comparaison lactate de sodium hypertonique exogène et SSH semble intéressante afin d'évaluer l'impact propre d'une perfusion de lactate comme substrat énergétique dans l'amélioration du métabolisme cérébral en dehors de son effet anti oedémateux. Enfin, afin de valider le bénéfice neurologique comportemental attendu par ces thérapeutiques et notamment par le lactate de sodium, des tests neurocomportementaux sont à réaliser dans un futur proche. Ces tests permettront de valider les propriétés bénéfiques sur le métabolisme cérébral de cette molécule dans notre modèle.

.

Références

Abate, M.G., Trivedi, M., Fryer, T. D., et al: Early derangements in oxygen and glucose metabolism following head injury: the ischemic penumbra and pathophysiological heterogeneity. Neurocrit Care 2008; 9:319–325

Adamides, A. A., D. J. Cooper, F. L. Rosenfeldt, M. J. Bailey, N. Pratt, N. Tippett, S. Vallance and J. V. Rosenfeld (2009). "Focal cerebral oxygenation and neurological outcome with or without brain tissue oxygen-guided therapy in patients with traumatic brain injury." Acta Neurochir (Wien) 151(11): 1399-1409.

Adembri, C., A. Massagrande, A. Tani, M. Miranda, M. Margheri, R. De Gaudio and D. E. Pellegrini-Giampietro (2008). "Carbamylated erythropoietin is neuroprotective in an experimental model of traumatic brain injury." Crit Care Med 36(3): 975-978.

Alessandri, B., E. Doppenberg, A. Zauner, J. Woodward, S. Choi and R. Bullock (1999). "Evidence for time-dependent glutamate-mediated glycolysis in head-injured patients: a microdialysis study." Acta Neurochir Suppl 75: 25-28.

Alessandri, B., E. Schwandt, Y. Kamada, M. Nagata, A. Heimann and O. Kempski (2012). "The neuroprotective effect of lactate is not due to improved glutamate uptake after controlled cortical impact in rats." J Neurotrauma 29(12): 2181-2191.

Amorini, A. M., G. Lazzarino, V. Di Pietro, S. Signoretti, G. Lazzarino, A. Belli and B. Tavazzi (2016). "Metabolic, enzymatic and gene involvement in cerebral glucose dysmetabolism after traumatic brain injury." Biochim Biophys Acta 1862(4): 679-687.

Andersen, B. J. and A. Marmarou (1992). "Post-traumatic selective stimulation of glycolysis." Brain Res 585(1-2): 184-189.

Aramendi, I., W. Manzanares and A. Biestro (2016). "[Half-molar sodium-lactate: The osmotic agent we are looking for?]." Med Intensiva 40(2): 113-117.

Araujo, I. M., B. P. Carreira, C. M. Carvalho and A. P. Carvalho (2010). "Calpains and delayed calcium deregulation in excitotoxicity." Neurochem Res 35(12): 1966-1969.

Attwell, D., A. M. Buchan, S. Charpak, M. Lauritzen, B. A. Macvicar and E. A. Newman (2010). "Glial and neuronal control of brain blood flow." Nature 468(7321): 232-243.

Bak, L. K., A. B. Walls, A. Schousboe, A. Ring, U. Sonnewald and H. S. Waagepetersen (2009). "Neuronal glucose but not lactate utilization is positively correlated with NMDA-induced neurotransmission and fluctuations in cytosolic Ca2+ levels." J Neurochem 109 Suppl 1: 87-93.

Bareyre, F., F. Wahl, T. K. McIntosh and J. M. Stutzmann (1997). "Time course of cerebral edema after traumatic brain injury in rats: effects of riluzole and mannitol." J Neurotrauma 14(11): 839-849.

Bartnik, B. L., R. L. Sutton, M. Fukushima, N. G. Harris, D. A. Hovda and S. M. Lee (2005). "Upregulation of pentose phosphate pathway and preservation of tricarboxylic acid cycle flux after experimental brain injury." J Neurotrauma 22(10): 1052-1065.

Barzo, P., A. Marmarou, P. Fatouros, K. Hayasaki and F. Corwin (1997). "Biphasic pathophysiological response of vasogenic and cellular edema in traumatic brain swelling." Acta Neurochir Suppl 70: 119-122.

Basso, E., V. Petronilli, M. A. Forte and P. Bernardi (2008). "Phosphate is essential for inhibition of the mitochondrial permeability transition pore by cyclosporin A and by cyclophilin D ablation." J Biol Chem 283(39): 26307-26311.

Battison, C., P. J. Andrews, C. Graham and T. Petty (2005). "Randomized, controlled trial on the effect of a 20% mannitol solution and a 7.5% saline/6% dextran solution on increased intracranial pressure after brain injury." Crit Care Med 33(1): 196-202; discussion 257-198.

Bazil, J. N. and R. K. Dash (2011). "A minimal model for the mitochondrial rapid mode of Ca 2+ uptake mechanism." PLoS One. 2011;6(6):e21324

Beaumont, A., P. Fatouros, T. Gennarelli, F. Corwin and A. Marmarou (2006). "Bolus tracer delivery measured by MRI confirms edema without blood-brain barrier permeability in diffuse traumatic brain injury." Acta Neurochir Suppl 96: 171-174.

Benard, G. and R. Rossignol (2008). "Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics." Antioxid Redox Signal 10(8): 1313-1342.

Benardete, E. A. (2012). "Hyperosmolar therapy for raised intracranial pressure." N Engl J Med 367(26): 2556; author reply 2556-2557.

Bergsneider, M., D. A. Hovda, S. M. Lee, D. F. Kelly, D. L. McArthur, P. M. Vespa, J. H. Lee, S. C. Huang, N. A. Martin, M. E. Phelps and D. P. Becker (2000). "Dissociation of cerebral glucose metabolism and level of consciousness during the period of metabolic depression following human traumatic brain injury." J Neurotrauma 17(5): 389-401.

Bergsneider, M., D. A. Hovda, E. Shalmon, D. F. Kelly, P. M. Vespa, N. A. Martin, M. E. Phelps, D. L. McArthur, M. J. Caron, J. F. Kraus and D. P. Becker (1997). "Cerebral hyperglycolysis following severe traumatic brain injury in humans: a positron emission tomography study." J Neurosurg 86(2): 241-251.

Bernardi, P. (1999). "Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition." Physiol Rev 79(4): 1127-1155.

Bernardi, P., S. Vassanelli, P. Veronese, R. Colonna, I. Szabo and M. Zoratti (1992). "Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations." J Biol Chem 267(5): 2934-2939.

Bernardi, P., P. Veronese and V. Petronilli (1993). "Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. I. Evidence for two separate

Me2+ binding sites with opposing effects on the pore open probability." J Biol Chem 268(2): 1005-1010.

Berthet, C., H. Lei, J. Thevenet, R. Gruetter, P. J. Magistretti and L. Hirt (2009). "Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia." J Cereb Blood Flow Metab 29(11): 1780-1789.

Beutner, G., A. Ruck, B. Riede and D. Brdiczka (1998). "Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases." Biochim Biophys Acta 1368(1): 7-18.

Beynon, C., K. L. Kiening, B. Orakcioglu, A. W. Unterberg and O. W. Sakowitz (2012). "Brain tissue oxygen monitoring and hyperoxic treatment in patients with traumatic brain injury." J Neurotrauma 29(12): 2109-2123.

Bisri, T., B. A. Utomo and I. Fuadi (2016). "Exogenous lactate infusion improved neurocognitive function of patients with mild traumatic brain injury." Asian J Neurosurg 11(2): 151-159.

Bohman, L. E., G. G. Heuer, L. Macyszyn, E. Maloney-Wilensky, S. Frangos, P. D. Le Roux, A. Kofke, J. M. Levine and M. F. Stiefel (2011). "Medical management of compromised brain oxygen in patients with severe traumatic brain injury." Neurocrit Care 14(3): 361-369.

Borutaite, V. and G. C. Brown (2003). "Mitochondria in apoptosis of ischemic heart." FEBS Lett 541(1-3): 1-5.

Bouma, G. J. and J. P. Muizelaar (1992). "Cerebral blood flow, cerebral blood volume, and cerebrovascular reactivity after severe head injury." J Neurotrauma 9 Suppl 1: S333-348.

Bouma, G. J., J. P. Muizelaar, K. Bandoh and A. Marmarou (1992). "Blood pressure and intracranial pressure-volume dynamics in severe head injury: relationship with cerebral blood flow." J Neurosurg 77(1): 15-19.

Boumezbeur, F., K. F. Petersen, G. W. Cline, G. F. Mason, K. L. Behar, G. I. Shulman and D. L. Rothman (2010). "The contribution of blood lactate to brain energy metabolism in humans measured by dynamic 13C nuclear magnetic resonance spectroscopy." J Neurosci 30(42): 13983-13991.

Bouzat, P., G. Francony, S. Thomas, S. Valable, F. Mauconduit, M. C. Fevre, E. L. Barbier, M. Bernaudin, H. Lahrech and J. F. Payen (2011). "Reduced brain edema and functional deficits after treatment of diffuse traumatic brain injury by carbamylated erythropoietin derivative." Crit Care Med 39(9): 2099-2105.

Bouzat, P., P. J. Magistretti and M. Oddo (2014). "Hypertonic lactate and the injured brain: facts and the potential for positive clinical implications." Intensive Care Med 40(6): 920-921.

Bouzat, P., A. Millet, Y. Boue, K. Pernet-Gallay, T. Trouve-Buisson, L. Gaide-Chevronnay, E. L. Barbier and J. F. Payen (2013). "Changes in brain tissue oxygenation after treatment of diffuse traumatic brain injury by erythropoietin." Crit Care Med 41(5): 1316-1324.

Bouzat, P. and M. Oddo (2014). "Lactate and the injured brain: friend or foe?" Curr Opin Crit Care.

Bouzat, P., N. Sala, T. Suys, J. B. Zerlauth, P. Marques-Vidal, F. Feihl, J. Bloch, M. Messerer, M. Levivier, R. Meuli, P. J. Magistretti and M. Oddo (2014). "Cerebral metabolic effects of exogenous lactate supplementation on the injured human brain." Intensive Care Med 40(3): 412-421.

Bramlett, H. M., W. D. Dietrich, C. E. Dixon, D. A. Shear, K. E. Schmid, S. Mondello, K. K. Wang, R. L. Hayes, J. T. Povlishock, F. C. Tortella and P. M. Kochanek (2016). "Erythropoietin Treatment in Traumatic Brain Injury: Operation Brain Trauma Therapy." J Neurotrauma 33(6): 538-552.

Bratton, S. L., R. M. Chestnut, J. Ghajar, F. F. McConnell Hammond, O. A. Harris, R. Hartl, G. T. Manley, A. Nemecek, D. W. Newell, G. Rosenthal, J. Schouten, L. Shutter, S. D. Timmons, J. S. Ullman, W. Videtta, J. E. Wilberger and D. W. Wright (2007). "Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. I. Blood pressure and oxygenation." J Neurotrauma 24 Suppl 1: S7-13.

Bredesen, D. E., R. V. Rao and P. Mehlen (2006). "Cell death in the nervous system." Nature 443(7113): 796-802.

Brines, M. L., P. Ghezzi, S. Keenan, D. Agnello, N. C. de Lanerolle, C. Cerami, L. M. Itri and A. Cerami (2000). "Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury." Proc Natl Acad Sci U S A 97(19): 10526-10531.

Brittain, M. K., T. Brustovetsky, P. L. Sheets, J. M. Brittain, R. Khanna, T. R. Cummins and N. Brustovetsky (2012). "Delayed calcium dysregulation in neurons requires both the NMDA receptor and the reverse Na+/Ca2+ exchanger." Neurobiol Dis 46(1): 109-117.

Brooks, G. A. (1986). "The lactate shuttle during exercise and recovery." Med Sci Sports Exerc 18(3): 360-368.

Brown, D. A., M. A. Aon, F. G. Akar, T. Liu, N. Sorarrain and B. O'Rourke (2008). "Effects of 4'-chlorodiazepam on cellular excitation-contraction coupling and ischaemia-reperfusion injury in rabbit heart." Cardiovasc Res 79(1): 141-149.

Buchner, K., J. Meixensberger, J. Dings and K. Roosen (2000). "Near-infrared spectroscopy--not useful to monitor cerebral oxygenation after severe brain injury." Zentralbl Neurochir 61(2): 69-73.

Buki, A., D. O. Okonkwo and J. T. Povlishock (1999). "Postinjury cyclosporin A administration limits axonal damage and disconnection in traumatic brain injury." J Neurotrauma 16(6): 511-521.

Buki, A., D. O. Okonkwo, K. K. Wang and J. T. Povlishock (2000). "Cytochrome c release and caspase activation in traumatic axonal injury." J Neurosci 20(8): 2825-2834.

Burgess, S., R. B. Abu-Laban, R. S. Slavik, E. N. Vu and P. J. Zed (2016). "A Systematic Review of Randomized Controlled Trials Comparing Hypertonic Sodium Solutions and Mannitol for Traumatic Brain Injury: Implications for Emergency Department Management." Ann Pharmacother 50(4): 291-300.

Burke, A. M., D. O. Quest, S. Chien and C. Cerri (1981). "The effects of mannitol on blood viscosity." J Neurosurg 55(4): 550-553.

Candelario-Jalil, E., Y. Yang and G. A. Rosenberg (2009). "Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia." Neuroscience 158(3): 983-994.

Cao, Y., Y. Gao, S. Xu, J. Bao, Y. Lin, X. Luo, Y. Wang, Q. Luo, J. Jiang, J. H. Neale and C. Zhong (2016). "Glutamate carboxypeptidase II gene knockout attenuates oxidative stress and cortical apoptosis after traumatic brain injury." BMC Neurosci 17: 15.

Carpenter, K. L., I. Jalloh, C. N. Gallagher, P. Grice, D. J. Howe, A. Mason, I. Timofeev, A. Helmy, M. P. Murphy, D. K. Menon, P. J. Kirkpatrick, T. A. Carpenter, G. R. Sutherland, J. D. Pickard and P. J. Hutchinson (2014). "(13)C-labelled microdialysis studies of cerebral metabolism in TBI patients." Eur J Pharm Sci 57: 87-97.

Carpenter, K. L., I. Jalloh and P. J. Hutchinson (2015). "Glycolysis and the significance of lactate in traumatic brain injury." Front Neurosci 9: 112.

Carre, E., M. Ogier, H. Boret, A. Montcriol, L. Bourdon and R. Jean-Jacques (2013). "Metabolic crisis in severely head-injured patients: is ischemia just the tip of the iceberg?" Front Neurol 4: 146.

Cebak, J. E., I. N. Singh, R. L. Hill, J. Wang and E. D. Hall (2016). "Phenelzine protects brain mitochondrial function in vitro and in vivo following traumatic brain injury by scavenging the reactive carbonyls 4-hydroxynonenal and acrolein leading to histological neuroprotection." J Neurotrauma.

Cernak, I., S. M. Chapman, G. P. Hamlin and R. Vink (2002). "Temporal characterisation of pro- and anti-apoptotic mechanisms following diffuse traumatic brain injury in rats." J Clin Neurosci 9(5): 565-572.

Chang, J. J., T. S. Youn, D. Benson, H. Mattick, N. Andrade, C. R. Harper, C. B. Moore, C. J. Madden and R. R. Diaz-Arrastia (2009). "Physiologic and functional outcome correlates of brain tissue hypoxia in traumatic brain injury." Crit Care Med 37(1): 283-290.

Chen, H., Y. L. Chan, L. T. Nguyen, Y. Mao, A. de Rosa, I. T. Beh, C. Chee, B. Oliver, G. Herok, S. Saad and C. Gorrie (2016). "Moderate traumatic brain injury is

linked to acute behaviour deficits and long term mitochondrial alterations." Clin Exp Pharmacol Physiol 43(11): 1107-1114.

Chen, S. F., H. J. Tsai, T. H. Hung, C. C. Chen, C. Y. Lee, C. H. Wu, P. Y. Wang and N. C. Liao (2012). "Salidroside improves behavioral and histological outcomes and reduces apoptosis via PI3K/Akt signaling after experimental traumatic brain injury." PLoS One 7(9): e45763.

Chen, T., Y. Z. Qian, A. Rice, J. P. Zhu, X. Di and R. Bullock (2000). "Brain lactate uptake increases at the site of impact after traumatic brain injury." Brain Res 861(2): 281-287.

Chen, Y. and R. A. Swanson (2003). "Astrocytes and brain injury." J Cereb Blood Flow Metab 23(2): 137-149.

Cheng, G., L. Fu, H. Y. Zhang, Y. M. Wang, L. M. Zhang and J. N. Zhang (2013). "The role of mitochondrial calcium uniporter in neuroprotection in traumatic brain injury." Med Hypotheses 80(2): 115-117.

Chiara, F., D. Castellaro, O. Marin, V. Petronilli, W. S. Brusilow, M. Juhaszova, S. J. Sollott, M. Forte, P. Bernardi and A. Rasola (2008). "Hexokinase II detachment from mitochondria triggers apoptosis through the permeability transition pore independent of voltage-dependent anion channels." PLoS One 3(3): e1852.

Chih, C. P. and E. L. Roberts Jr (2003). "Energy substrates for neurons during neural activity: a critical review of the astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis." J Cereb Blood Flow Metab 23(11): 1263-1281.

Christen, T., B. Lemasson, N. Pannetier, R. Farion, C. Segebarth, C. Remy and E. L. Barbier (2011). "Evaluation of a quantitative blood oxygenation level-dependent (qBOLD) approach to map local blood oxygen saturation." NMR Biomed 24(4): 393-403.

Coles, J. P., T. D. Fryer, P. Smielewski, D. A. Chatfield, L. A. Steiner, A. J. Johnston, S. P. Downey, G. B. Williams, F. Aigbirhio, P. J. Hutchinson, K. Rice, T. A. Carpenter, J. C. Clark, J. D. Pickard and D. K. Menon (2004). "Incidence and mechanisms of cerebral ischemia in early clinical head injury." J Cereb Blood Flow Metab 24(2): 202-211.

Coles, J. P., P. S. Minhas, T. D. Fryer, P. Smielewski, F. Aigbirihio, T. Donovan, S. P. Downey, G. Williams, D. Chatfield, J. C. Matthews, A. K. Gupta, T. A. Carpenter, J. C. Clark, J. D. Pickard and D. K. Menon (2002). "Effect of hyperventilation on cerebral blood flow in traumatic head injury: clinical relevance and monitoring correlates." Crit Care Med 30(9): 1950-1959.

Corrigan, J. D., A. W. Selassie and J. A. Orman (2010). "The epidemiology of traumatic brain injury." J Head Trauma Rehabil 25(2): 72-80.

Cottenceau, V., F. Masson, E. Mahamid, L. Petit, V. Shik, F. Sztark, M. Zaaroor and J. F. Soustiel (2011). "Comparison of effects of equiosmolar doses of mannitol and

hypertonic saline on cerebral blood flow and metabolism in traumatic brain injury." J Neurotrauma 28(10): 2003-2012.

Crompton, M. (2000). "Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death." J Physiol 529 Pt 1: 11-21.

Cruz, J., G. Minoja and K. Okuchi (2001). "Improving clinical outcomes from acute subdural hematomas with the emergency preoperative administration of high doses of mannitol: a randomized trial." Neurosurgery 49(4): 864-871.

Cruz, J., G. Minoja and K. Okuchi (2002). "Major clinical and physiological benefits of early high doses of mannitol for intraparenchymal temporal lobe hemorrhages with abnormal pupillary widening: a randomized trial." Neurosurgery 51(3): 628-637; discussion 637-628.

Cruz, J., G. Minoja, K. Okuchi and E. Facco (2004). "Successful use of the new high-dose mannitol treatment in patients with Glasgow Coma Scale scores of 3 and bilateral abnormal pupillary widening: a randomized trial." J Neurosurg 100(3): 376-383.

Cruz, J., E. C. Raps, O. J. Hoffstad, J. L. Jaggi and T. A. Gennarelli (1993). "Cerebral oxygenation monitoring." Crit Care Med 21(8): 1242-1246.

Cunningham, A. S., R. Salvador, J. P. Coles, D. A. Chatfield, P. G. Bradley, A. J. Johnston, L. A. Steiner, T. D. Fryer, F. I. Aigbirhio, P. Smielewski, G. B. Williams, T. A. Carpenter, J. H. Gillard, J. D. Pickard and D. K. Menon (2005). "Physiological thresholds for irreversible tissue damage in contusional regions following traumatic brain injury." Brain 128(Pt 8): 1931-1942.

Dai, W., H. L. Cheng, R. Q. Huang, Z. Zhuang and J. X. Shi (2009). "Quantitative detection of the expression of mitochondrial cytochrome c oxidase subunits mRNA in the cerebral cortex after experimental traumatic brain injury." Brain Res 1251: 287-295.

Dawson, V. L. and T. M. Dawson (1996). "Nitric oxide neurotoxicity." J Chem Neuroanat 10(3-4): 179-190.

Dienel, G. A. (2014). "Lactate shuttling and lactate use as fuel after traumatic brain injury: metabolic considerations." J Cereb Blood Flow Metab 34(11): 1736-1748.

Dienel, G. A., D. L. Rothman and C. H. Nordstrom (2016). "Microdialysate concentration changes do not provide sufficient information to evaluate metabolic effects of lactate supplementation in brain-injured patients." J Cereb Blood Flow Metab 36(11): 1844-1864.

Dietrich, W. D., O. Alonso and M. Halley (1994). "Early microvascular and neuronal consequences of traumatic brain injury: a light and electron microscopic study in rats." J Neurotrauma 11(3): 289-301.

Ding, J. Y., C. W. Kreipke, S. L. Speirs, P. Schafer, S. Schafer and J. A. Rafols (2009). "Hypoxia-inducible factor-1alpha signaling in aquaporin upregulation after traumatic brain injury." Neurosci Lett 453(1): 68-72.

DiNuzzo, M., S. Mangia, B. Maraviglia and F. Giove (2010). "Changes in glucose uptake rather than lactate shuttle take center stage in subserving neuroenergetics: evidence from mathematical modeling." J Cereb Blood Flow Metab 30(3): 586-602.

Diringer, M .N., T. O. Videen, K. Yundt, A. R. Zazulia, V. Aiyagari, R. G. Dacey Jr, R. L. Grubb and W. J. Powers. (2002). " Regional cerebrovascular and metabolic effects of hyperventilation after severe traumatic brain injury." J Neurosurg Jan;96(1):103-8.

Diringer, M. N., M. T. Scalfani, A. R. Zazulia, T. O. Videen, R. Dhar and W. J. Powers (2012). "Effect of mannitol on cerebral blood volume in patients with head injury." Neurosurgery 70(5): 1215-1218; discussion 1219.

Donkin, J. J., A. J. Nimmo, I. Cernak, P. C. Blumbergs and R. Vink (2009). "Substance P is associated with the development of brain edema and functional deficits after traumatic brain injury." J Cereb Blood Flow Metab 29(8): 1388-1398.

Donkin, J. J. and R. Vink (2010). "Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments." Curr Opin Neurol 23(3): 293-299.

Doppenberg, E. M., A. Zauner, J. C. Watson and R. Bullock (1998). "Determination of the ischemic threshold for brain oxygen tension." Acta Neurochir Suppl 71: 166-169.

Dusick, J. R., T. C. Glenn, W. N. Lee, P. M. Vespa, D. F. Kelly, S. M. Lee, D. A. Hovda and N. A. Martin (2007). "Increased pentose phosphate pathway flux after clinical traumatic brain injury: a [1,2-13C2]glucose labeling study in humans." J Cereb Blood Flow Metab 27(9): 1593-1602.

Eldadah, B. A. and A. I. Faden (2000). "Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury." J Neurotrauma 17(10): 811-829.

Enriquez, P. and R. Bullock (2004). "Molecular and cellular mechanisms in the pathophysiology of severe head injury." Curr Pharm Des 10(18): 2131-2143.

Farooqui, A. A. and L. A. Horrocks (1994). "Excitotoxicity and neurological disorders: involvement of membrane phospholipids." Int Rev Neurobiol 36: 267-323.

Fazzina, G., A. M. Amorini, C. R. Marmarou, S. Fukui, K. Okuno, J. G. Dunbar, R. Glisson, A. Marmarou and A. Kleindienst (2010). "The protein kinase C activator phorbol myristate acetate decreases brain edema by aquaporin 4 downregulation after middle cerebral artery occlusion in the rat." J Neurotrauma 27(2): 453-461.

Fellows, L. K., M. G. Boutelle and M. Fillenz (1992). "Extracellular brain glucose levels reflect local neuronal activity: a microdialysis study in awake, freely moving rats." J Neurochem 59(6): 2141-2147.

Fiore, C., V. Trezeguet, A. Le Saux, P. Roux, C. Schwimmer, A. C. Dianoux, F. Noel, G. J. Lauquin, G. Brandolin and P. V. Vignais (1998). "The mitochondrial ADP/ATP carrier: structural, physiological and pathological aspects." Biochimie 80(2): 137-150.

Fiskum, G. (2000). "Mitochondrial participation in ischemic and traumatic neural cell death." J Neurotrauma 17(10): 843-855.

Fontaine, E., O. Eriksson, F. Ichas and P. Bernardi (1998). "Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex i." J Biol Chem 273(20): 12662-12668.

Fortune, J. B., P. J. Feustel, L. Graca, J. Hasselbarth and D. H. Kuehler (1995). "Effect of hyperventilation, mannitol, and ventriculostomy drainage on cerebral blood flow after head injury." J Trauma 39(6): 1091-1097; discussion 1097-1099.

Francony, G., B. Fauvage, D. Falcon, C. Canet, H. Dilou, P. Lavagne, C. Jacquot and J. F. Payen (2008). "Equimolar doses of mannitol and hypertonic saline in the treatment of increased intracranial pressure." Crit Care Med 36(3): 795-800.

Fu, T. S., R. Jing, W. W. Fu and M. D. Cusimano (2016). "Epidemiological Trends of Traumatic Brain Injury Identified in the Emergency Department in a Publicly-Insured Population, 2002-2010." PLoS One 11(1): e0145469.

Gajavelli, S., V. K. Sinha, A. T. Mazzeo, M. S. Spurlock, S. W. Lee, A. I. Ahmed, S. Yokobori and R. M. Bullock (2015). "Evidence to support mitochondrial neuroprotection, in severe traumatic brain injury." J Bioenerg Biomembr 47(1-2): 133-148.

Gallagher, C. N., K. L. Carpenter, P. Grice, D. J. Howe, A. Mason, I. Timofeev, D. K. Menon, P. J. Kirkpatrick, J. D. Pickard, G. R. Sutherland and P. J. Hutchinson (2009). "The human brain utilizes lactate via the tricarboxylic acid cycle: a 13C-labelled microdialysis and high-resolution nuclear magnetic resonance study." Brain 132(Pt 10): 2839-2849.

Galluzzi, L., K. Blomgren and G. Kroemer (2009). "Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury." Nat Rev Neurosci 10(7): 481-494.

Gandhi, G. K., N. F. Cruz, K. K. Ball and G. A. Dienel (2009). "Astrocytes are poised for lactate trafficking and release from activated brain and for supply of glucose to neurons." J Neurochem 111(2): 522-536.

Gantner, D., E. M. Moore and D. J. Cooper (2014). "Intravenous fluids in traumatic brain injury: what's the solution?" Curr Opin Crit Care 20(4): 385-389.

Gasche, Y., M. Fujimura, Y. Morita-Fujimura, J. C. Copin, M. Kawase, J. Massengale and P. H. Chan (1999). "Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9

after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction." J Cereb Blood Flow Metab 19(9): 1020-1028.

Gasco, J., J. Sendra, J. Lim and I. Ng (2005). "Linear correlation between stable intracranial pressure decrease and regional cerebral oxygenation improvement following mannitol administration in severe acute head injury patients." Acta Neurochir Suppl 95: 73-77.

Glenn, T. C., D. F. Kelly, W. J. Boscardin, D. L. McArthur, P. Vespa, M. Oertel, D. A. Hovda, M. Bergsneider, L. Hillered and N. A. Martin (2003). "Energy dysfunction as a predictor of outcome after moderate or severe head injury: indices of oxygen, glucose, and lactate metabolism." J Cereb Blood Flow Metab 23(10): 1239-1250.

Glenn, T. C., N. A. Martin, D. L. McArthur, D. A. Hovda, P. Vespa, M. L. Johnson, M. A. Horning and G. A. Brooks (2015). "Endogenous Nutritive Support after Traumatic Brain Injury: Peripheral Lactate Production for Glucose Supply via Gluconeogenesis." J Neurotrauma 32(11): 811-819.

Goetz, P., A. Blamire, B. Rajagopalan, T. Cadoux-Hudson, D. Young and P. Styles (2004). "Increase in apparent diffusion coefficient in normal appearing white matter following human traumatic brain injury correlates with injury severity." J Neurotrauma 21(6): 645-654.

Goodman, J. C., A. B. Valadka, S. P. Gopinath, M. Uzura and C. S. Robertson (1999). "Extracellular lactate and glucose alterations in the brain after head injury measured by microdialysis." Crit Care Med 27(9): 1965-1973.

Gordon, G. R., H. B. Choi, R. L. Rungta, G. C. Ellis-Davies and B. A. MacVicar (2008). "Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles." Nature 456(7223): 745-749.

Graham, D. I., J. H. Adams and D. Doyle (1978). "Ischaemic brain damage in fatal non-missile head injuries." J Neurol Sci 39(2-3): 213-234.

Grasso, G., A. Sfacteria, F. Meli, V. Fodale, M. Buemi and D. G. Iacopino (2007). "Neuroprotection by erythropoietin administration after experimental traumatic brain injury." Brain Res 1182: 99-105.

Halestrap, A. P. (2009). "What is the mitochondrial permeability transition pore?" J Mol Cell Cardiol 46(6): 821-831.

Halestrap, A. P., S. J. Clarke and S. A. Javadov (2004). "Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection." Cardiovasc Res 61(3): 372-385.

Halestrap, A. P. and A. M. Davidson (1990). "Inhibition of Ca2(+)-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase." Biochem J 268(1): 153-160.

Halestrap, A. P., G. P. McStay and S. J. Clarke (2002). "The permeability transition pore complex: another view." Biochimie 84(2-3): 153-166.

Halestrap, A. P. and A. P. Richardson (2015). "The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury." J Mol Cell Cardiol 78: 129-141.

Halestrap, A. P., K. Y. Woodfield and C. P. Connern (1997). "Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase." J Biol Chem 272(6): 3346-3354.

Hansson, M. J., S. Morota, L. Chen, N. Matsuyama, Y. Suzuki, S. Nakajima, T. Tanoue, A. Omi, F. Shibasaki, M. Shimazu, Y. Ikeda, H. Uchino and E. Elmer (2011). "Cyclophilin D-sensitive mitochondrial permeability transition in adult human brain and liver mitochondria." J Neurotrauma 28(1): 143-153.

Haorah, J., S. H. Ramirez, K. Schall, D. Smith, R. Pandya and Y. Persidsky (2007). "Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction." J Neurochem 101(2): 566-576.

Harmon, J. L., W. S. Gibbs, R. M. Whitaker, R. G. Schnellmann and D. L. Adkins (2016). "Striatal Mitochondrial Disruption following Severe Traumatic Brain Injury." J Neurotrauma.

Harris, L. K., R. T. Black, K. M. Golden, T. M. Reeves, J. T. Povlishock and L. L. Phillips (2001). "Traumatic brain injury-induced changes in gene expression and functional activity of mitochondrial cytochrome C oxidase." J Neurotrauma 18(10): 993-1009.

Hartl, R., T. F. Bardt, K. L. Kiening, A. S. Sarrafzadeh, G. H. Schneider and A. W. Unterberg (1997). "Mannitol decreases ICP but does not improve brain-tissue pO2 in severely head-injured patients with intracranial hypertension." Acta Neurochir Suppl 70: 40-42.

Hartley, C. E., M. Varma, J. P. Fischer, R. Riccardi, J. A. Strauss, S. Shah, S. Zhang and Z. J. Yang (2008). "Neuroprotective effects of erythropoietin on acute metabolic and pathological changes in experimentally induced neurotrauma." J Neurosurg 109(4): 708-714.

Hartwell, R. C. and L. N. Sutton (1993). "Mannitol, intracranial pressure, and vasogenic edema." Neurosurgery 32(3): 444-450; discussion 450.

Haworth, R. A. and D. R. Hunter (1979). "The Ca2+-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca2+ trigger site." Arch Biochem Biophys 195(2): 460-467.

Helbok, R., P. Kurtz, J. M. Schmidt, R. M. Stuart, L. Fernandez, R. Malhotra, M. Presciutti, N. D. Ostapkovich, E. S. Connolly, K. Lee, N. Badjatia, S. A. Mayer and J.

Claassen (2011). "Effect of mannitol on brain metabolism and tissue oxygenation in severe haemorrhagic stroke." J Neurol Neurosurg Psychiatry 82(4): 378-383.

Hellal, F., D. Bonnefont-Rousselot, N. Croci, B. Palmier, M. Plotkine and C. Marchand-Verrecchia (2004). "Pattern of cerebral edema and hemorrhage in a mice model of diffuse brain injury." Neurosci Lett 357(1): 21-24.

Hirt, L., B. Ternon, M. Price, N. Mastour, J. F. Brunet and J. Badaut (2009). "Protective role of early aquaporin 4 induction against postischemic edema formation." J Cereb Blood Flow Metab 29(2): 423-433.

Holloway, R., Z. Zhou, H. B. Harvey, J. E. Levasseur, A. C. Rice, D. Sun, R. J. Hamm and M. R. Bullock (2007). "Effect of lactate therapy upon cognitive deficits after traumatic brain injury in the rat." Acta Neurochir (Wien) 149(9): 919-927; discussion 927.

Hutchinson, P. J., M. T. O'Connell, A. Seal, J. Nortje, I. Timofeev, P. G. Al-Rawi, J. P. Coles, T. D. Fryer, D. K. Menon, J. D. Pickard and K. L. Carpenter (2009). "A combined microdialysis and FDG-PET study of glucose metabolism in head injury." Acta Neurochir (Wien) 151(1): 51-61; discussion 61.

Ichai, C., G. Armando, J. C. Orban, F. Berthier, L. Rami, C. Samat-Long, D. Grimaud and X. Leverve (2009). "Sodium lactate versus mannitol in the treatment of intracranial hypertensive episodes in severe traumatic brain-injured patients." Intensive Care Med 35(3): 471-479.

Ichai, C., J. F. Payen, J. C. Orban, H. Quintard, H. Roth, R. Legrand, G. Francony and X. M. Leverve (2013). "Half-molar sodium lactate infusion to prevent intracranial hypertensive episodes in severe traumatic brain injured patients: a randomized controlled trial." Intensive Care Med 39(8): 1413-1422.

Inao, S., H. Kuchiwaki, A. Wachi, K. Andoh, M. Nagasaka, K. Sugita and M. Furuse (1990). "Effect of mannitol on intracranial pressure-volume status and cerebral haemodynamics in brain oedema." Acta Neurochir Suppl (Wien) 51: 401-403.

Ito, J., A. Marmarou, P. Barzo, P. Fatouros and F. Corwin (1996). "Characterization of edema by diffusion-weighted imaging in experimental traumatic brain injury." J Neurosurg 84(1): 97-103.

Jagannatha, A. T., S. Kamath, I. Devi and U. G. Rao (2016). "376 The Salt Versus Sugar Debate: Urinary Sodium Losses Following Hypertonic Saline Administration Curtails Its Superior Osmolar Effect in Comparison to Mannitol in Severe Traumatic Brain Injury." Neurosurgery 63 Suppl 1: 212.

Jaggi, J. L., W. D. Obrist, T. A. Gennarelli and T. W. Langfitt (1990). "Relationship of early cerebral blood flow and metabolism to outcome in acute head injury." J Neurosurg 72(2): 176-182.

Jalloh, I., K. L. Carpenter, A. Helmy, T. A. Carpenter, D. K. Menon and P. J. Hutchinson (2015). "Glucose metabolism following human traumatic brain injury:

methods of assessment and pathophysiological findings." Metab Brain Dis 30(3): 615-632.

Johnston, A. J., L. A. Steiner, J. P. Coles, D. A. Chatfield, T. D. Fryer, P. Smielewski, P. J. Hutchinson, M. T. O'Connell, P. G. Al-Rawi, F. I. Aigbirihio, J. C. Clark, J. D. Pickard, A. K. Gupta and D. K. Menon (2005). "Effect of cerebral perfusion pressure augmentation on regional oxygenation and metabolism after head injury." Crit Care Med 33(1): 189-195; discussion 255-187.

Kaufmann, A. M. and E. R. Cardoso (1992). "Aggravation of vasogenic cerebral edema by multiple-dose mannitol." J Neurosurg 77(4): 584-589.

Ker, K. and K. Blackhall (2008). "Beta-2 receptor antagonists for acute traumatic brain injury." Cochrane Database Syst Rev(1): Cd006686.

Kiening, K. L., R. Hartl, A. W. Unterberg, G. H. Schneider, T. Bardt and W. R. Lanksch (1997). "Brain tissue pO2-monitoring in comatose patients: implications for therapy." Neurol Res 19(3): 233-240.

Kiening, K. L., A. W. Unterberg, T. F. Bardt, G. H. Schneider and W. R. Lanksch (1996). "Monitoring of cerebral oxygenation in patients with severe head injuries: brain tissue PO2 versus jugular vein oxygen saturation." J Neurosurg 85(5): 751-757.

Kilbaugh, T. J., M. Lvova, M. Karlsson, Z. Zhang, J. Leipzig, D. C. Wallace and S. S. Margulies (2015). "Peripheral Blood Mitochondrial DNA as a Biomarker of Cerebral Mitochondrial Dysfunction following Traumatic Brain Injury in a Porcine Model." PLoS One 10(6): e0130927.

Kimelberg, H. K. (2004). "Water homeostasis in the brain: basic concepts." Neuroscience 129(4): 851-860.

Kinnally, K. W., D. B. Zorov, Y. N. Antonenko, S. H. Snyder, M. W. McEnery and H. Tedeschi (1993). "Mitochondrial benzodiazepine receptor linked to inner membrane ion channels by nanomolar actions of ligands." Proc Natl Acad Sci U S A 90(4): 1374-1378.

Kobayashi, H., T. Miura, H. Ishida, T. Miki, M. Tanno, T. Yano, T. Sato, H. Hotta and K. Shimamoto (2008). "Limitation of infarct size by erythropoietin is associated with translocation of Akt to the mitochondria after reperfusion." Clin Exp Pharmacol Physiol 35(7): 812-819.

Kokoszka, J. E., K. G. Waymire, S. E. Levy, J. E. Sligh, J. Cai, D. P. Jones, G. R. MacGregor and D. C. Wallace (2004). "The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore." Nature 427(6973): 461-465.

Kramer, A. H., D. J. Roberts and D. A. Zygun (2012). "Optimal glycemic control in neurocritical care patients: a systematic review and meta-analysis." Crit Care 16(5): R203.

Kristal, B. S., I. G. Stavrovskaya, M. V. Narayanan, B. F. Krasnikov, A. M. Brown, M. F. Beal and R. M. Friedlander (2004). "The mitochondrial permeability transition as a target for neuroprotection." J Bioenerg Biomembr 36(4): 309-312.

Kruger, N. J. and J. B. Hammond (1988). "Immunodetection of proteins on "western" blots using (125)i-labeled protein a." Methods Mol Biol 3: 409-417.

Kulbe, J. R., R. L. Hill, I. N. Singh, J. A. Wang and E. D. Hall (2016). "Synaptic Mitochondria Sustain More Damage than Non-Synaptic Mitochondria after Traumatic Brain Injury and Are Protected by Cyclosporine A." J Neurotrauma.

Levasseur, J. E., B. Alessandri, M. Reinert, T. Clausen, Z. Zhou, N. Altememi and M. R. Bullock (2006). "Lactate, not glucose, up-regulates mitochondrial oxygen consumption both in sham and lateral fluid percussed rat brains." Neurosurgery 59(5): 1122-1130; discussion 1130-1121.

Li, M., T. Chen, S. D. Chen, J. Cai and Y. H. Hu (2015). "Comparison of equimolar doses of mannitol and hypertonic saline for the treatment of elevated intracranial pressure after traumatic brain injury: a systematic review and meta-analysis." Medicine (Baltimore) 94(17): e736.

Li, Z. M., Y. L. Xiao, J. X. Zhu, F. Y. Geng, C. J. Guo, Z. L. Chong and L. X. Wang (2016). "Recombinant human erythropoietin improves functional recovery in patients with severe traumatic brain injury: A randomized, double blind and controlled clinical trial." Clin Neurol Neurosurg 150: 80-83.

Liao, Z. B., X. G. Zhi, Q. H. Shi and Z. H. He (2008). "Recombinant human erythropoietin administration protects cortical neurons from traumatic brain injury in rats." Eur J Neurol 15(2): 140-149.

Liepert, J. (2016). "Update on pharmacotherapy for stroke and traumatic brain injury recovery during rehabilitation." Curr Opin Neurol 29(6): 700-705.

Lifshitz, J., P. A. Janmey and T. K. McIntosh (2006). "Photon correlation spectroscopy of brain mitochondrial populations: application to traumatic brain injury." Exp Neurol 197(2): 318-329.

Lifshitz, J., P. G. Sullivan, D. A. Hovda, T. Wieloch and T. K. McIntosh (2004). "Mitochondrial damage and dysfunction in traumatic brain injury." Mitochondrion 4(5-6): 705-713.

Liu, W. C., L. Wen, T. Xie, H. Wang, J. B. Gong and X. F. Yang (2016). "Therapeutic effect of erythropoietin in patients with traumatic brain injury: a meta-analysis of randomized controlled trials." J Neurosurg: 1-8.

Liu, Y., X. J. Liu and D. Sun (2009). "Ion transporters and ischemic mitochondrial dysfunction." Cell Adh Migr 3(1): 94-98.

Llompart-Pou, J. A., M. Chico-Fernandez, M. Sanchez-Casado, F. Alberdi-Odriozola, F. Guerrero-Lopez, M. D. Mayor-Garcia, J. Gonzalez-Robledo, M. A. Ballesteros-

Sanz, R. Herran-Monge, R. Leon-Lopez, L. Lopez-Amor and A. Bueno-Gonzalez (2016). "Age-related injury patterns in Spanish trauma ICU patients. Results from the RETRAUCI." Injury 47 Suppl 3: S61-s65.

Long, D. M. (1982). "Traumatic brain edema." Clin Neurosurg 29: 174-202.

Longhi, L., F. Pagan, V. Valeriani, S. Magnoni, E. R. Zanier, V. Conte, V. Branca and N. Stocchetti (2007). "Monitoring brain tissue oxygen tension in brain-injured patients reveals hypoxic episodes in normal-appearing and in peri-focal tissue." Intensive Care Med 33(12): 2136-2142.

Lu, D., A. Mahmood, C. Qu, A. Goussev, T. Schallert and M. Chopp (2005). "Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain injury." J Neurotrauma 22(9): 1011-1017.

Luypaert, R., S. Boujraf, S. Sourbron and M. Osteaux (2001). "Diffusion and perfusion MRI: basic physics." Eur J Radiol 38(1): 19-27.

Maas, A. I., N. Stocchetti and R. Bullock (2008). "Moderate and severe traumatic brain injury in adults." Lancet Neurol 7(8): 728-741.

Mahmood, A., D. Lu, C. Qu, A. Goussev, Z. G. Zhang, C. Lu and M. Chopp (2007). "Treatment of traumatic brain injury in rats with erythropoietin and carbamylated erythropoietin." J Neurosurg 107(2): 392-397.

Manley, G. T., M. Fujimura, T. Ma, N. Noshita, F. Filiz, A. W. Bollen, P. Chan and A. S. Verkman (2000). "Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke." Nat Med 6(2): 159-163.

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

Marmarou, A., P. P. Fatouros, P. Barzo, G. Portella, M. Yoshihara, O. Tsuji, T. Yamamoto, F. Laine, S. Signoretti, J. D. Ward, M. R. Bullock and H. F. Young (2000). "Contribution of edema and cerebral blood volume to traumatic brain swelling in head-injured patients." J Neurosurg 93(2): 183-193.

Marmarou, A., M. A. Foda, W. van den Brink, J. Campbell, H. Kita and K. Demetriadou (1994). "A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics." J Neurosurg 80(2): 291-300.

Marmarou, A., G. Portella, P. Barzo, S. Signoretti, P. Fatouros, A. Beaumont, T. Jiang and R. Bullock (2000). "Distinguishing between cellular and vasogenic edema in head injured patients with focal lesions using magnetic resonance imaging." Acta Neurochir Suppl 76: 349-351.

Marmarou, A., S. Signoretti, P. P. Fatouros, G. Portella, G. A. Aygok and M. R. Bullock (2006). "Predominance of cellular edema in traumatic brain swelling in patients with severe head injuries." J Neurosurg 104(5): 720-730.

Mazzeo, A. T., A. Beat, A. Singh and M. R. Bullock (2009). "The role of mitochondrial transition pore, and its modulation, in traumatic brain injury and delayed neurodegeneration after TBI." Exp Neurol 218(2): 363-370.

McArthur, D. L., D. J. Chute and J. P. Villablanca (2004). "Moderate and severe traumatic brain injury: epidemiologic, imaging and neuropathologic perspectives." Brain Pathol 14(2): 185-194.

McCarthy, M. C., H. Moncrief, J. M. Sands, R. J. Markert, L. C. Hall, I. C. Wenker, H. L. Anderson, 3rd, A. P. Ekeh, M. S. Walusimbi, R. J. Woods, J. M. Saxe and K. M. Tchorz (2009). "Neurologic outcomes with cerebral oxygen monitoring in traumatic brain injury." Surgery 146(4): 585-590; discussion 590-581.

McEnery, M. W., A. M. Snowman, R. R. Trifiletti and S. H. Snyder (1992). "Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier." Proc Natl Acad Sci U S A 89(8): 3170-3174.

Meng, Y., Y. Xiong, A. Mahmood, Y. Zhang, C. Qu and M. Chopp (2011). "Dose-dependent neurorestorative effects of delayed treatment of traumatic brain injury with recombinant human erythropoietin in rats." J Neurosurg 115(3): 550-560.

Menon, D. K., J. P. Coles, A. K. Gupta, T. D. Fryer, P. Smielewski, D. A. Chatfield, F. Aigbirhio, J. N. Skepper, P. S. Minhas, P. J. Hutchinson, T. A. Carpenter, J. C. Clark and J. D. Pickard (2004). "Diffusion limited oxygen delivery following head injury." Crit Care Med 32(6): 1384-1390.

Menzel, M., E. M. Doppenberg, A. Zauner, J. Soukup, M. M. Reinert and R. Bullock (1999). "Increased inspired oxygen concentration as a factor in improved brain tissue oxygenation and tissue lactate levels after severe human head injury." J Neurosurg 91(1): 1-10.

Menzel, M., E. M. Doppenberg, A. Zauner, J. Soukup, M. M. Reinert, T. Clausen, P. B. Brockenbrough and R. Bullock (1999). "Cerebral oxygenation in patients after severe head injury: monitoring and effects of arterial hyperoxia on cerebral blood flow, metabolism and intracranial pressure." J Neurosurg Anesthesiol 11(4): 240-251.

Merenda, A. and R. Bullock (2006). "Clinical treatments for mitochondrial dysfunctions after brain injury." Curr Opin Crit Care 12(2): 90-96.

Morganti-Kossmann, M. C., L. Satgunaseelan, N. Bye and T. Kossmann (2007). "Modulation of immune response by head injury." Injury 38(12): 1392-1400.

Nakagawa, T., S. Shimizu, T. Watanabe, O. Yamaguchi, K. Otsu, H. Yamagata, H. Inohara, T. Kubo and Y. Tsujimoto (2005). "Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death." Nature 434(7033): 652-658.

Narotam, P. K., J. F. Morrison and N. Nathoo (2009). "Brain tissue oxygen monitoring in traumatic brain injury and major trauma: outcome analysis of a brain tissue oxygen-directed therapy." J Neurosurg 111(4): 672-682.

Nichol, A., C. French, L. Little, S. Haddad, J. Presneill, Y. Arabi, M. Bailey, D. J. Cooper, J. Duranteau, O. Huet, A. Mak, C. McArthur, V. Pettila, M. Skrifvars, S. Vallance, D. Varma, J. Wills and R. Bellomo (2015). "Erythropoietin in traumatic brain injury (EPO-TBI): a double-blind randomised controlled trial." Lancet 386(10012): 2499-2506.

Nichol, A., L. Little and C. French (2014). "Erythropoietin for traumatic brain injury." Jama 312(18): 1928-1929.

Nicolli, A., E. Basso, V. Petronilli, R. M. Wenger and P. Bernardi (1996). "Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporin A-sensitive channel." J Biol Chem 271(4): 2185-2192.

Nielsen, T. H., T. T. Bindslev, S. M. Pedersen, P. Toft, N. V. Olsen and C. H. Nordstrom (2013). "Cerebral energy metabolism during induced mitochondrial dysfunction." Acta Anaesthesiol Scand 57(2): 229-235.

Nincevic, Z., J. Mestrovic, J. Nincevic, Z. Sundov and D. Kuscevic (2015). "Low-dose mannitol (0.3 g kg(-1)) improves the pulsatility index and minimum diastolic blood flow velocity in traumatic brain injury." Brain Inj 29(6): 766-771.

Nishihara, M., T. Miura, T. Miki, M. Tanno, T. Yano, K. Naitoh, K. Ohori, H. Hotta, Y. Terashima and K. Shimamoto (2007). "Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection." J Mol Cell Cardiol 43(5): 564-570.

Nortje, J. and A. K. Gupta (2006). "The role of tissue oxygen monitoring in patients with acute brain injury." Br J Anaesth 97(1): 95-106.

Nury, H., C. Dahout-Gonzalez, V. Trezeguet, G. Lauquin, G. Brandolin and E. Pebay-Peyroula (2005). "Structural basis for lipid-mediated interactions between mitochondrial ADP/ATP carrier monomers." FEBS Lett 579(27): 6031-6036.

O'Gorman, E., G. Beutner, M. Dolder, A. P. Koretsky, D. Brdiczka and T. Wallimann (1997). "The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition." FEBS Lett 414(2): 253-257.

Oddo, M. (2013). "Erythropoietin to enhance protection and oxygenation after traumatic brain injury." Crit Care Med 41(5): 1380-1381.

Oddo, M., J. M. Levine, S. Frangos, E. Carrera, E. Maloney-Wilensky, J. L. Pascual, W. A. Kofke, S. A. Mayer and P. D. LeRoux (2009). "Effect of mannitol and hypertonic saline on cerebral oxygenation in patients with severe traumatic brain injury and refractory intracranial hypertension." J Neurol Neurosurg Psychiatry 80(8): 916-920.

Oddo, M., J. M. Levine, L. Mackenzie, S. Frangos, F. Feihl, S. E. Kasner, M. Katsnelson, B. Pukenas, E. Macmurtrie, E. Maloney-Wilensky, W. A. Kofke and P. D. LeRoux (2011). "Brain hypoxia is associated with short-term outcome after severe traumatic brain injury independently of intracranial hypertension and low cerebral perfusion pressure." Neurosurgery 69(5): 1037-1045; discussion 1045.

Oddo, M., J. M. Schmidt, E. Carrera, N. Badjatia, E. S. Connolly, M. Presciutti, N. D. Ostapkovich, J. M. Levine, P. Le Roux and S. A. Mayer (2008). "Impact of tight glycemic control on cerebral glucose metabolism after severe brain injury: a microdialysis study." Crit Care Med 36(12): 3233-3238.

Olesen, J., A. Gustavsson, M. Svensson, H. U. Wittchen and B. Jonsson (2012). "The economic cost of brain disorders in Europe." Eur J Neurol 19(1): 155-162.

Paczynski, R. P., Y. Y. He, M. N. Diringer and C. Y. Hsu (1997). "Multiple-dose mannitol reduces brain water content in a rat model of cortical infarction." Stroke 28(7): 1437-1443; discussion 1444.

Papadopoulos, M. C. and A. S. Verkman (2007). "Aquaporin-4 and brain edema." Pediatr Nephrol 22(6): 778-784.

Patel, A. B., J. C. Lai, G. M. Chowdhury, F. Hyder, D. L. Rothman, R. G. Shulman and K. L. Behar (2014). "Direct evidence for activity-dependent glucose phosphorylation in neurons with implications for the astrocyte-to-neuron lactate shuttle." Proc Natl Acad Sci U S A 111(14): 5385-5390.

Patet, C., T. Suys, L. Carteron and M. Oddo (2016). "Cerebral Lactate Metabolism After Traumatic Brain Injury." Curr Neurol Neurosci Rep 16(4): 31.

Payen, J. F., B. Fauvage, D. Falcon and P. Lavagne (2003). "[Brain oedema following blood-brain barrier disruption: mechanisms and diagnosis]." Ann Fr Anesth Reanim 22(3): 220-225.

Pedersen, M. O., A. Larsen, D. S. Pedersen, M. Stoltenberg and M. Penkowa (2009). "Metallic gold reduces TNFalpha expression, oxidative DNA damage and pro-apoptotic signals after experimental brain injury." Brain Res 1271: 103-113.

Pellerin, L. and P. J. Magistretti (1994). "Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization." Proc Natl Acad Sci U S A 91(22): 10625-10629.

Pellerin, L. and P. J. Magistretti (2012). "Sweet sixteen for ANLS." J Cereb Blood Flow Metab 32(7): 1152-1166.

Peng, W., Z. Xing, J. Yang, Y. Wang, W. Wang and W. Huang (2014). "The efficacy of erythropoietin in treating experimental traumatic brain injury: a systematic review of controlled trials in animal models." J Neurosurg 121(3): 653-664.

Petrosillo, G., G. Casanova, M. Matera, F. M. Ruggiero and G. Paradies (2006). "Interaction of peroxidized cardiolipin with rat-heart mitochondrial membranes: induction of permeability transition and cytochrome c release." FEBS Lett 580(27): 6311-6316.

Pettus, E. H., C. W. Christman, M. L. Giebel and J. T. Povlishock (1994). "Traumatically induced altered membrane permeability: its relationship to traumatically induced reactive axonal change." J Neurotrauma 11(5): 507-522.

Pike, B. R., X. Zhao, J. K. Newcomb, C. C. Glenn, D. K. Anderson and R. L. Hayes (2000). "Stretch injury causes calpain and caspase-3 activation and necrotic and apoptotic cell death in septo-hippocampal cell cultures." J Neurotrauma 17(4): 283-298.

Plesnila, N., J. Schulz, M. Stoffel, J. Eriskat, D. Pruneau and A. Baethmann (2001). "Role of bradykinin B2 receptors in the formation of vasogenic brain edema in rats." J Neurotrauma 18(10): 1049-1058.

Prabhakar, H., K. Sandhu, H. Bhagat, P. Durga and R. Chawla (2014). "Current concepts of optimal cerebral perfusion pressure in traumatic brain injury." J Anaesthesiol Clin Pharmacol 30(3): 318-327.

Prieto, R., B. Tavazzi, K. Taya, L. Barrios, A. M. Amorini, V. Di Pietro, J. M. Pascual, A. Marmarou and C. R. Marmarou (2011). "Brain energy depletion in a rodent model of diffuse traumatic brain injury is not prevented with administration of sodium lactate." Brain Res 1404: 39-49.

Prins, M. L. and C. C. Giza (2006). "Induction of monocarboxylate transporter 2 expression and ketone transport following traumatic brain injury in juvenile and adult rats." Dev Neurosci 28(4-5): 447-456.

Purins, K., A. Lewen, L. Hillered, T. Howells and P. Enblad (2014). "Brain tissue oxygenation and cerebral metabolic patterns in focal and diffuse traumatic brain injury." Front Neurol 5: 64.

Quintard, H., C. Patet, J. B. Zerlauth, T. Suys, P. Bouzat, L. Pellerin, R. Meuli, P. J. Magistretti and M. Oddo (2016). "Improvement of Neuroenergetics by Hypertonic Lactate Therapy in Patients with Traumatic Brain Injury Is Dependent on Baseline Cerebral Lactate/Pyruvate Ratio." J Neurotrauma 33(7): 681-687.

Rao, W., L. Zhang, C. Peng, H. Hui, K. Wang, N. Su, L. Wang, S. H. Dai, Y. F. Yang, T. Chen, P. Luo and Z. Fei (2015). "Downregulation of STIM2 improves neuronal survival after traumatic brain injury by alleviating calcium overload and mitochondrial dysfunction." Biochim Biophys Acta 1852(11): 2402-2413.

Rasola, A. and P. Bernardi (2011). "Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis." Cell Calcium 50(3): 222-233.

Rasola, A., M. Sciacovelli, B. Pantic and P. Bernardi (2010). "Signal transduction to the permeability transition pore." FEBS Lett 584(10): 1989-1996.

Readnower, R. D., J. D. Pandya, M. L. McEwen, J. R. Pauly, J. E. Springer and P. G. Sullivan (2011). "Post-injury administration of the mitochondrial permeability transition pore inhibitor, NIM811, is neuroprotective and improves cognition after traumatic brain injury in rats." J Neurotrauma 28(9): 1845-1853.

Rice, A. C., R. Zsoldos, T. Chen, M. S. Wilson, B. Alessandri, R. J. Hamm and M. R. Bullock (2002). "Lactate administration attenuates cognitive deficits following traumatic brain injury." Brain Res 928(1-2): 156-159.

Ringel, F., R. C. Chang, F. Staub, A. Baethmann and N. Plesnila (2000). "Contribution of anion transporters to the acidosis-induced swelling and intracellular acidification of glial cells." J Neurochem 75(1): 125-132.

Robertson, C. S., H. J. Hannay, J. M. Yamal, S. Gopinath, J. C. Goodman, B. C. Tilley, A. Baldwin, L. Rivera Lara, H. Saucedo-Crespo, O. Ahmed, S. Sadasivan, L. Ponce, J. Cruz-Navarro, H. Shahin, I. P. Aisiku, P. Doshi, A. Valadka, L. Neipert, J. M. Waguspack, M. L. Rubin, J. S. Benoit and P. Swank (2014). "Effect of erythropoietin and transfusion threshold on neurological recovery after traumatic brain injury: a randomized clinical trial." Jama 312(1): 36-47.

Robertson, C. S., R. K. Narayan, Z. L. Gokaslan, R. Pahwa, R. G. Grossman, P. Caram, Jr. and E. Allen (1989). "Cerebral arteriovenous oxygen difference as an estimate of cerebral blood flow in comatose patients." J Neurosurg 70(2): 222-230.

Rodriguez-Baeza, A., F. Reina-de la Torre, A. Poca, M. Marti and A. Garnacho (2003). "Morphological features in human cortical brain microvessels after head injury: a three-dimensional and immunocytochemical study." Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 273(1): 583-593.

Ropper, A. H. (2012). "Hyperosmolar therapy for raised intracranial pressure." N Engl J Med 367(8): 746-752.

Rosenthal, G., J. C. Hemphill, 3rd, M. Sorani, C. Martin, D. Morabito, W. D. Obrist and G. T. Manley (2008). "Brain tissue oxygen tension is more indicative of oxygen diffusion than oxygen delivery and metabolism in patients with traumatic brain injury." Crit Care Med 36(6): 1917-1924.

Rostami, E. (2014). "Glucose and the injured brain-monitored in the neurointensive care unit." Front Neurol 5: 91.

Sakellaridis, N., E. Pavlou, S. Karatzas, D. Chroni, K. Vlachos, K. Chatzopoulos, E. Dimopoulou, C. Kelesis and V. Karaouli (2011). "Comparison of mannitol and hypertonic saline in the treatment of severe brain injuries." J Neurosurg 114(2): 545-548.

Sakowitz, O. W., J. F. Stover, A. S. Sarrafzadeh, A. W. Unterberg and K. L. Kiening (2007). "Effects of mannitol bolus administration on intracranial pressure, cerebral extracellular metabolites, and tissue oxygenation in severely head-injured patients." J Trauma 62(2): 292-298.

Sala, N., T. Suys, J. B. Zerlauth, P. Bouzat, M. Messerer, J. Bloch, M. Levivier, P. J. Magistretti, R. Meuli and M. Oddo (2013). "Cerebral extracellular lactate increase is predominantly nonischemic in patients with severe traumatic brain injury." J Cereb Blood Flow Metab 33(11): 1815-1822.

Salvant, J. B., Jr. and J. P. Muizelaar (1993). "Changes in cerebral blood flow and metabolism related to the presence of subdural hematoma." Neurosurgery 33(3): 387-393; discussion 393.

Satchell, M. A., Y. Lai, P. M. Kochanek, S. R. Wisniewski, E. L. Fink, N. A. Siedberg, R. P. Berger, S. T. DeKosky, P. D. Adelson and R. S. Clark (2005). "Cytochrome c, a biomarker of apoptosis, is increased in cerebrospinal fluid from infants with inflicted brain injury from child abuse." J Cereb Blood Flow Metab 25(7): 919-927.

Scalfani, M. T., R. Dhar, A. R. Zazulia, T. O. Videen and M. N. Diringer (2012). "Effect of osmotic agents on regional cerebral blood flow in traumatic brain injury." J Crit Care 27(5): 526.e527-512.

Schaefer, P. W., T. A. Huisman, A. G. Sorensen, R. G. Gonzalez and L. H. Schwamm (2004). "Diffusion-weighted MR imaging in closed head injury: high correlation with initial glasgow coma scale score and score on modified Rankin scale at discharge." Radiology Oct;233(1):58-66.

Scheufler, K. M., H. J. Rohrborn and J. Zentner (2002). "Does tissue oxygen-tension reliably reflect cerebral oxygen delivery and consumption?" Anesth Analg 95(4): 1042-1048, table of contents.

Schinzel, A. C., O. Takeuchi, Z. Huang, J. K. Fisher, Z. Zhou, J. Rubens, C. Hetz, N. N. Danial, M. A. Moskowitz and S. J. Korsmeyer (2005). "Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia." Proc Natl Acad Sci U S A 102(34): 12005-12010.

Scholten, A. C., J. A. Haagsma, M. J. Panneman, E. F. van Beeck and S. Polinder (2014). "Traumatic brain injury in the Netherlands: incidence, costs and disability-adjusted life years." PLoS One 9(10): e110905.

Schurr, A. (2006). "Lactate: the ultimate cerebral oxidative energy substrate?" J Cereb Blood Flow Metab 26(1): 142-152.

Schurr, A. (2014). "Cerebral glycolysis: a century of persistent misunderstanding and misconception." Front Neurosci 8: 360.

Schurr, A. and R. S. Payne (2007). "Lactate, not pyruvate, is neuronal aerobic glycolysis end product: an in vitro electrophysiological study." Neuroscience 147(3): 613-619.

Schurr, A., C. A. West and B. M. Rigor (1988). "Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation." Science 240(4857): 1326-1328.

Serres, S., E. Bezancon, J. M. Franconi and M. Merle (2004). "Ex vivo analysis of lactate and glucose metabolism in the rat brain under different states of depressed activity." J Biol Chem 279(46): 47881-47889.

Shackford, S. R., J. Zhuang and J. Schmoker (1992). "Intravenous fluid tonicity: effect on intracranial pressure, cerebral blood flow, and cerebral oxygen delivery in focal brain injury." J Neurosurg 76(1): 91-98.

Shenaq, M., H. Kassem, C. Peng, S. Schafer, J. Y. Ding, V. Fredrickson, M. Guthikonda, C. W. Kreipke, J. A. Rafols and Y. Ding (2012). "Neuronal damage and functional deficits are ameliorated by inhibition of aquaporin and HIF1alpha after traumatic brain injury (TBI)." J Neurol Sci 323(1-2): 134-140.

Shigemori, Y., Y. Katayama, T. Mori, T. Maeda and T. Kawamata (2006). "Matrix metalloproteinase-9 is associated with blood-brain barrier opening and brain edema formation after cortical contusion in rats." Acta Neurochir Suppl 96: 130-133.

Signoretti, S., A. Marmarou, G. A. Aygok, P. P. Fatouros, G. Portella and R. M. Bullock (2008). "Assessment of mitochondrial impairment in traumatic brain injury using high-resolution proton magnetic resonance spectroscopy." J Neurosurg 108(1): 42-52.

Simpson, I. A., A. Carruthers and S. J. Vannucci (2007). "Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters." J Cereb Blood Flow Metab 27(11): 1766-1791.

Singh, I. N., L. K. Gilmer, D. M. Miller, J. E. Cebak, J. A. Wang and E. D. Hall (2013). "Phenelzine mitochondrial functional preservation and neuroprotection after traumatic brain injury related to scavenging of the lipid peroxidation-derived aldehyde 4-hydroxy-2-nonenal." J Cereb Blood Flow Metab 33(4): 593-599.

Singh, I. N., P. G. Sullivan, Y. Deng, L. H. Mbye and E. D. Hall (2006). "Time course of post-traumatic mitochondrial oxidative damage and dysfunction in a mouse model of focal traumatic brain injury: implications for neuroprotective therapy." J Cereb Blood Flow Metab 26(11): 1407-1418.

Sinha, S., A. Raheja, N. Samson, S. Bhoi, A. Selvi, P. Sharma and B. S. Sharma (2016). "Blood mitochondrial enzymatic assay as a predictor of long-term outcome in severe traumatic brain injury." J Clin Neurosci 30: 31-38.

Siren, A. L., T. Fasshauer, C. Bartels and H. Ehrenreich (2009). "Therapeutic potential of erythropoietin and its structural or functional variants in the nervous system." Neurotherapeutics 6(1): 108-127.

Slemmer, J. E., C. Zhu, S. Landshamer, R. Trabold, J. Grohm, A. Ardeshiri, E. Wagner, M. I. Sweeney, K. Blomgren, C. Culmsee, J. T. Weber and N. Plesnila (2008). "Causal role of apoptosis-inducing factor for neuronal cell death following traumatic brain injury." Am J Pathol 173(6): 1795-1805.

Sokoloff, L., M. Reivich, C. Kennedy, M. H. Des Rosiers, C. S. Patlak, K. D. Pettigrew, O. Sakurada and M. Shinohara (1977). "The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat." J Neurochem 28(5): 897-916.

Sorani, M. D., D. Morabito, G. Rosenthal, K. M. Giacomini and G. T. Manley (2008). "Characterizing the dose-response relationship between mannitol and intracranial pressure in traumatic brain injury patients using a high-frequency physiological data collection system." J Neurotrauma 25(4): 291-298.

Soustiel, J. F. and G. E. Sviri (2007). "Monitoring of cerebral metabolism: non-ischemic impairment of oxidative metabolism following severe traumatic brain injury." Neurol Res 29(7): 654-660.

Spees, W. M., D. A. Yablonskiy, M. C. Oswood and J. J. Ackerman (2001). "Water proton MR properties of human blood at 1.5 Tesla: magnetic susceptibility, T(1), T(2), T*(2), and non-Lorentzian signal behavior." Magn Reson Med 45(4): 533-542.

Spiotta, A. M., M. F. Stiefel, V. H. Gracias, A. M. Garuffe, W. A. Kofke, E. Maloney-Wilensky, A. B. Troxel, J. M. Levine and P. D. Le Roux (2010). "Brain tissue oxygen-directed management and outcome in patients with severe traumatic brain injury." J Neurosurg 113(3): 571-580.

Stein, N. R., D. L. McArthur, M. Etchepare and P. M. Vespa (2012). "Early cerebral metabolic crisis after TBI influences outcome despite adequate hemodynamic resuscitation." Neurocrit Care 17(1): 49-57.

Sterns, R. H. (2015). "Disorders of plasma sodium--causes, consequences, and correction." N Engl J Med 372(1): 55-65.

Stiefel, M. F., A. Spiotta, V. H. Gracias, A. M. Garuffe, O. Guillamondegui, E. Maloney-Wilensky, S. Bloom, M. S. Grady and P. D. LeRoux (2005). "Reduced mortality rate in patients with severe traumatic brain injury treated with brain tissue oxygen monitoring." J Neurosurg 103(5): 805-811.

Stuart, C. A., I. R. Ross, M. E. Howell, M. P. McCurry, T. G. Wood, J. D. Ceci, S. J. Kennel and J. Wall (2011). "Brain glucose transporter (Glut3) haploinsufficiency does not impair mouse brain glucose uptake." Brain Res 1384: 15-22.

Stys, P. K. and R. M. Lopachin (1998). "Mechanisms of calcium and sodium fluxes in anoxic myelinated central nervous system axons." Neuroscience 82(1): 21-32.

Sullivan, P. G., A. G. Rabchevsky, P. C. Waldmeier and J. E. Springer (2005). "Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death?" J Neurosci Res 79(1-2): 231-239.

Sullivan, P. G., M. B. Thompson and S. W. Scheff (1999). "Cyclosporin A attenuates acute mitochondrial dysfunction following traumatic brain injury." Exp Neurol 160(1): 226-234.

Suzuki, A., S. A. Stern, O. Bozdagi, G. W. Huntley, R. H. Walker, P. J. Magistretti and C. M. Alberini (2011). "Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation." Cell 144(5): 810-823.

Tabarean, I. V., P. Juranka and C. E. Morris (1999). "Membrane stretch affects gating modes of a skeletal muscle sodium channel." Biophys J 77(2): 758-774.

Tagliaferri, F., C. Compagnone, M. Korsic, F. Servadei and J. Kraus (2006). "A systematic review of brain injury epidemiology in Europe." Acta Neurochir (Wien) 148(3): 255-268; discussion 268.

Tamareille, S., N. Ghaboura, F. Treguer, D. Khachman, A. Croue, D. Henrion, A. Furber and F. Prunier (2009). "Myocardial reperfusion injury management: erythropoietin compared with postconditioning." Am J Physiol Heart Circ Physiol 297(6): H2035-2043.

Tan, C. C., K. U. Eckardt, J. D. Firth and P. J. Ratcliffe (1992). "Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia." Am J Physiol 263(3 Pt 2): F474-481.

Tang, S. C., R. J. Lin, J. S. Shieh, A. Y. Wu, D. M. Lai, S. J. Huang and J. S. Jeng (2015). "Effect of mannitol on cerebrovascular pressure reactivity in patients with intracranial hypertension." J Formos Med Assoc 114(9): 842-848.

Timofeev, I., K. L. Carpenter, J. Nortje, P. G. Al-Rawi, M. T. O'Connell, M. Czosnyka, P. Smielewski, J. D. Pickard, D. K. Menon, P. J. Kirkpatrick, A. K. Gupta and P. J. Hutchinson (2011). "Cerebral extracellular chemistry and outcome following traumatic brain injury: a microdialysis study of 223 patients." Brain 134(Pt 2): 484-494.

Timofeev, I., M. Czosnyka, K. L. Carpenter, J. Nortje, P. J. Kirkpatrick, P. G. Al-Rawi, D. K. Menon, J. D. Pickard, A. K. Gupta and P. J. Hutchinson (2011). "Interaction between brain chemistry and physiology after traumatic brain injury: impact of autoregulation and microdialysis catheter location." J Neurotrauma 28(6): 849-860.

Unterberg, A. W., K. L. Kiening, R. Hartl, T. Bardt, A. S. Sarrafzadeh and W. R. Lanksch (1997). "Multimodal monitoring in patients with head injury: evaluation of the effects of treatment on cerebral oxygenation." J Trauma 42(5 Suppl): S32-37.

Unterberg, A. W., J. Stover, B. Kress and K. L. Kiening (2004). "Edema and brain trauma." Neuroscience 129(4): 1021-1029.

Valable, S., G. Francony, P. Bouzat, M. C. Fevre, N. Mahious, V. Bouet, R. Farion, E. Barbier, H. Lahrech, C. Remy, E. Petit, C. Segebarth, M. Bernaudin and J. F. Payen (2010). "The impact of erythropoietin on short-term changes in phosphorylation of brain protein kinases in a rat model of traumatic brain injury." J Cereb Blood Flow Metab 30(2): 361-369.

Valadka, A. B., J. C. Goodman, S. P. Gopinath, M. Uzura and C. S. Robertson (1998). "Comparison of brain tissue oxygen tension to microdialysis-based measures of cerebral ischemia in fatally head-injured humans." J Neurotrauma 15(7): 509-519.

van Santbrink, H., A. I. Maas and C. J. Avezaat (1996). "Continuous monitoring of partial pressure of brain tissue oxygen in patients with severe head injury." Neurosurgery 38(1): 21-31.

Vaz, R., A. Sarmento, N. Borges, C. Cruz and I. Azevedo (1997). "Ultrastructural study of brain microvessels in patients with traumatic cerebral contusions." Acta Neurochir (Wien) 139(3): 215-220.

Veech, R. L., C. R. Valeri and T. B. VanItallie (2012). "The mitochondrial permeability transition pore provides a key to the diagnosis and treatment of traumatic brain injury." IUBMB Life 64(2): 203-207.

Verdonck, O., H. Lahrech, G. Francony, O. Carle, R. Farion, Y. Van de Looij, C. Remy, C. Segebarth and J. F. Payen (2007). "Erythropoietin protects from post-traumatic edema in the rat brain." J Cereb Blood Flow Metab 27(7): 1369-1376.

Verkman, A. S. (2009). "Knock-out models reveal new aquaporin functions." Handb Exp Pharmacol(190): 359-381.

Verweij, B. H., G. J. Amelink and J. P. Muizelaar (2007). "Current concepts of cerebral oxygen transport and energy metabolism after severe traumatic brain injury." Prog Brain Res 161: 111-124.

Verweij, B. H., J. P. Muizelaar, F. C. Vinas, P. L. Peterson, Y. Xiong and C. P. Lee (2000). "Impaired cerebral mitochondrial function after traumatic brain injury in humans." J Neurosurg 93(5): 815-820.

Verweij, B. H., J. P. Muizelaar, F. C. Vinas, P. L. Peterson, Y. Xiong and C. P. Lee (2000). "Improvement in mitochondrial dysfunction as a new surrogate efficiency measure for preclinical trials: dose-response and time-window profiles for administration of the calcium channel blocker Ziconotide in experimental brain injury." J Neurosurg 93(5): 829-834.

Vespa, P. (2003). "What is the optimal threshold for cerebral perfusion pressure following traumatic brain injury?" Neurosurg Focus 15(6): E4.

Vespa, P., M. Bergsneider, N. Hattori, H. M. Wu, S. C. Huang, N. A. Martin, T. C. Glenn, D. L. McArthur and D. A. Hovda (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(6): 763-774.

Vialet, R., J. Albanese, L. Thomachot, F. Antonini, A. Bourgouin, B. Alliez and C. Martin (2003). "Isovolume hypertonic solutes (sodium chloride or mannitol) in the treatment of refractory posttraumatic intracranial hypertension: 2 mL/kg 7.5% saline is more effective than 2 mL/kg 20% mannitol." Crit Care Med 31(6): 1683-1687.

Vieira, R. C., W. S. Paiva, D. V. de Oliveira, M. J. Teixeira, A. F. de Andrade and R. M. de Sousa (2016). "Diffuse Axonal Injury: Epidemiology, Outcome and Associated Risk Factors." Front Neurol 7: 178.

Vigue, B. and C. Ract (2014). "Treatments and outcome, the point in head trauma." Ann Fr Anesth Reanim 33(2): 110-114.

Vlodavsky, E., E. Palzur, M. Shehadeh and J. F. Soustiel (2015). "Post-traumatic cytotoxic edema is directly related to mitochondrial function." J Cereb Blood Flow Metab.

von Berenberg, P., A. Unterberg, G. H. Schneider and W. R. Lanksch (1994). "Treatment of traumatic brain edema by multiple doses of mannitol." Acta Neurochir Suppl (Wien) 60: 531-533.

Wakai, A., A. McCabe, I. Roberts and G. Schierhout (2013). "Mannitol for acute traumatic brain injury." Cochrane Database Syst Rev(8): Cd001049.

Walter, L., V. Nogueira, X. Leverve, M. P. Heitz, P. Bernardi and E. Fontaine (2000). "Three classes of ubiquinone analogs regulate the mitochondrial permeability transition pore through a common site." J Biol Chem 275(38): 29521-29527.

Wang, D., J. M. Pascual, H. Yang, K. Engelstad, X. Mao, J. Cheng, J. Yoo, J. L. Noebels and D. C. De Vivo (2006). "A mouse model for Glut-1 haploinsufficiency." Hum Mol Genet 15(7): 1169-1179.

Wang, G. H., Z. L. Jiang, Y. C. Li, X. Li, H. Shi, Y. Q. Gao, P. S. Vosler and J. Chen (2011). "Free-radical scavenger edaravone treatment confers neuroprotection against traumatic brain injury in rats." J Neurotrauma 28(10): 2123-2134.

Weber, J. T. (2004). "Calcium homeostasis following traumatic neuronal injury." Curr Neurovasc Res 1(2): 151-171.

Weber, J. T. (2012). "Altered calcium signaling following traumatic brain injury." Front Pharmacol 3: 60.

Weber, J. T., B. A. Rzigalinski and E. F. Ellis (2001). "Traumatic injury of cortical neurons causes changes in intracellular calcium stores and capacitative calcium influx." J Biol Chem 276(3): 1800-1807.

Werner, C. and K. Engelhard (2007). "Pathophysiology of traumatic brain injury." Br J Anaesth 99(1): 4-9.

Wolf, J. A., P. K. Stys, T. Lusardi, D. Meaney and D. H. Smith (2001). "Traumatic axonal injury induces calcium influx modulated by tetrodotoxin-sensitive sodium channels." J Neurosci 21(6): 1923-1930.

Wu, H. M., S. C. Huang, P. Vespa, D. A. Hovda and M. Bergsneider (2013). "Redefining the pericontusional penumbra following traumatic brain injury: evidence of deteriorating metabolic derangements based on positron emission tomography." J Neurotrauma 30(5): 352-360.

Wulff, H., A. Kolski-Andreaco, A. Sankaranarayanan, J. M. Sabatier and V. Shakkottai (2007). "Modulators of small- and intermediate-conductance calcium-

activated potassium channels and their therapeutic indications." Curr Med Chem 14(13): 1437-1457.

Wyss, M. T., R. Jolivet, A. Buck, P. J. Magistretti and B. Weber (2011). "In vivo evidence for lactate as a neuronal energy source." J Neurosci 31(20): 7477-7485.

Xiong, Y., D. Lu, C. Qu, A. Goussev, T. Schallert, A. Mahmood and M. Chopp (2008). "Effects of erythropoietin on reducing brain damage and improving functional outcome after traumatic brain injury in mice." J Neurosurg 109(3): 510-521.

Xiong, Y., A. Mahmood, Y. Meng, Y. Zhang, C. Qu, T. Schallert and M. Chopp (2010). "Delayed administration of erythropoietin reducing hippocampal cell loss, enhancing angiogenesis and neurogenesis, and improving functional outcome following traumatic brain injury in rats: comparison of treatment with single and triple dose." J Neurosurg 113(3): 598-608.

Xiong, Y., A. Mahmood, C. Qu, H. Kazmi, Z. G. Zhang, C. T. Noguchi, T. Schallert and M. Chopp (2010). "Erythropoietin improves histological and functional outcomes after traumatic brain injury in mice in the absence of the neural erythropoietin receptor." J Neurotrauma 27(1): 205-215.

Xiong, Y., A. Mahmood, Y. Zhang, Y. Meng, Z. G. Zhang, C. Qu, T. N. Sager and M. Chopp (2011). "Effects of posttraumatic carbamylated erythropoietin therapy on reducing lesion volume and hippocampal cell loss, enhancing angiogenesis and neurogenesis, and improving functional outcome in rats following traumatic brain injury." J Neurosurg 114(2): 549-559.

Xu, Y., D. L. McArthur, J. R. Alger, M. Etchepare, D. A. Hovda, T. C. Glenn, S. Huang, I. Dinov and P. M. Vespa (2010). "Early nonischemic oxidative metabolic dysfunction leads to chronic brain atrophy in traumatic brain injury." J Cereb Blood Flow Metab 30(4): 883-894.

Yao, X., K. Uchida, M. C. Papadopoulos, Z. Zador, G. T. M. D. P. D. Manley and A. S. Verkman (2015). "Mildly Reduced Brain Swelling and Improved Neurological Outcome in Aquaporin-4 Knockout Mice Following Controlled Cortical Impact Brain Injury." J Neurotrauma.

Yatsiv, I., N. Grigoriadis, C. Simeonidou, P. F. Stahel, O. I. Schmidt, A. G. Alexandrovitch, J. Tsenter and E. Shohami (2005). "Erythropoietin is neuroprotective, improves functional recovery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury." Faseb j 19(12): 1701-1703.

Yonutas, H. M., H. J. Vekaria and P. G. Sullivan (2016). "Mitochondrial specific therapeutic targets following brain injury." Brain Res 1640(Pt A): 77-93.

Zauner, A., T. Clausen, O. L. Alves, A. Rice, J. Levasseur, H. F. Young and R. Bullock (2002). "Cerebral metabolism after fluid-percussion injury and hypoxia in a feline model." J Neurosurg 97(3): 643-649.

Zauner, A., W. P. Daugherty, M. R. Bullock and D. S. Warner (2002). "Brain oxygenation and energy metabolism: part I-biological function and pathophysiology." Neurosurgery 51(2): 289-301; discussion 302.

Zauner, A., E. Doppenberg, J. J. Woodward, C. Allen, S. Jebraili, H. F. Young and R. Bullock (1997). "Multiparametric continuous monitoring of brain metabolism and substrate delivery in neurosurgical patients." Neurol Res 19(3): 265-273.

Zhang, L., B. A. Rzigalinski, E. F. Ellis and L. S. Satin (1996). "Reduction of voltage-dependent Mg2+ blockade of NMDA current in mechanically injured neurons." Science 274(5294): 1921-1923.

Zhao, B. Q., S. Wang, H. Y. Kim, H. Storrie, B. R. Rosen, D. J. Mooney, X. Wang and E. H. Lo (2006). "Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke." Nat Med 12(4): 441-445.

Zhao, J., G. Li, Y. Zhang, X. Su and C. Hang (2011). "The potential role of JAK2/STAT3 pathway on the anti-apoptotic effect of recombinant human erythropoietin (rhEPO) after experimental traumatic brain injury of rats." Cytokine 56(2): 343-350.

Zweckberger, K. and N. Plesnila (2009). "Anatibant, a selective non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist, reduces intracranial hypertension and histopathological damage after experimental traumatic brain injury." Neurosci Lett 454(2): 115-117.