



HAL
open science

Rôle des voies de signalisation de deux protéines kinases, Erk et Akt, dans l'effet anti-œdémateux de l'érythropoïétine

Marie-Cécile Fèvre

► **To cite this version:**

Marie-Cécile Fèvre. Rôle des voies de signalisation de deux protéines kinases, Erk et Akt, dans l'effet anti-œdémateux de l'érythropoïétine. Médecine humaine et pathologie. 2011. dumas-00631166

HAL Id: dumas-00631166

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00631166>

Submitted on 17 May 2012

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.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE

Année : 2011

N°

Rôle des voies de signalisation de deux
protéines kinases, Erk et Akt, dans l'effet
anti-œdémateux de l'érythropoïétine

THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE

DIPLÔME D'ETAT

Marie-Cécile FEVRE

Née le 4 décembre 1980 à Corbeil-Essonnes (91)

Thèse soutenue publiquement à la faculté de médecine de Grenoble*

Le jeudi 6 octobre 2011

Devant le jury composé de :

Président du jury :

Monsieur le Professeur Jean-François Payen

Membres :

Monsieur le Professeur Pierre Albaladejo

Monsieur le Professeur Emmanuel Gay

Monsieur le Docteur Gilles Francony (Directeur de thèse)

Monsieur le Docteur Pierre Bouzat

* La faculté de médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

Liste des professeurs des universités – Praticiens hospitaliers au 01/09/2010

Nom	PRENOM	ADRESSE 1	ADRESSE 2
ALBALADEJO	Pierre	CLINIQUE D'ANESTHESIE PÔLE 2 ANESTHESIE - REANIMATIONS	CHU
ARVIEUX-BARTHELEMY	Catherine	CLINIQUE DE CHIRURGIE ET DE L'URGENCE POLE 6 DIGIDUNE	CHU
BACONNIER	Pierre	BIostatistiques ET INFORMATIQUE MEDICALE PAVILLON D POLE 17 SANTE PUBLIQUE	CHU
BAGUET	Jean-Philippe	CLINIQUE DE CARDIOLOGIE / HYPERTENSION ARTERIELLE PÔLE 4 CARDIO VASC. & THORACIQUE	CHU
BALOSSO	Jacques	RADIODIAGNOSTIC PÔLE 5 CANCEROLOGIE	CHU
BARRET	Luc	CLINIQUE MEDECINE LEGALE PÔLE 8 PLURIDISCIPLINAIRE DE MEDECINE	CHU
BAUDAIN	Philippe	CLINIQUE RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE PÔLE 13 IMAGERIE	CHU
BEANI	Jean-Claude	CLINIQUE DERMATOLOGIE- VENEROLOGIE-PHOTOBIOLOGIE ET ALLERGOLOGIE PÔLE 8 PLURIDISCIPLINAIRE DE MEDECINE	CHU
BENHAMOU	Pierre-Yves	CLINIQUE ENDOCRINO DIABETO NUTRITION EDUCATION THERAPEUTIQUE / DIABETOLOGIE PÔLE 6 DIGIDUNE	CHU
BERGER	François	ONCOLOGIE MEDICALE PÔLE 5 CANCEROLOGIE	CHU
BLIN	Dominique	CLINIQUE CHIRURGIE CARDIAQUE PÔLE 4 CARDIO VASC. & THORACIQUE	CHU
BOLLA	Michel	CENTRE COORD. CANCEROLOGIE PÔLE 5 CANCEROLOGIE	CHU
BONAZ	Bruno	CLINIQUE HEPATO-GASTRO- ENTEROLOGIE PÔLE 6 DIGIDUNE	CHU
BOSSON	Jean-Luc	DPT DE METHODOLOGIE DE L'INFORMATION DE SANTE PÔLE 17 SANTE PUBLIQUE	CHU
BOUGEROL	Thierry	PSYCHIATRIE D'ADULTES PÔLE 10 PSYCHIATRIE & NEUROLOGIE	PAVILLON D. VILLARS CHU
BRAMBILLA	Elisabeth	DPT ANATOMIE & CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES PÔLE 14 BIOLOGIE	CHU
BRAMBILLA	Christian	CLINIQUE DE PNEUMOLOGIE PÔLE 7 MEDECINE AIGÛE & COMMUNAUTAIRE	CHU
BRICHON	Pierre-Yves	CLINIQUE DE CHIRURGIE VASCULAIRE & THORACIQUE PÔLE 4 CARDIO VASC. & THORACIQUE	CHU

Nom	PRENOM	ADRESSE 1	ADRESSE 2
BRIX	Muriel	CLINIQUE CHIR. MAXILLOFACIALE PÔLE 3 TÊTE & COU & CHIR. REPARATRICE	CHU
CAHN	Jean-Yves	CANCEROLOGIE PÔLE 5 CANCEROLOGIE	CHU
CARPENTIER	Patrick	CLINIQUE MEDECINE VASCULAIRE PÔLE 8 PLURIDISCIPLINAIRE DE MEDECINE	CHU
CARPENTIER	Françoise	CLINIQUE URGENCE PÔLE 1 SAMU SMUR	CHU
CESBRON	Jean-Yves	IMMUNOLOGIE PÔLE 14 BIOLOGIE	J. ROGET FACULTE DE MEDECINE
CHABARDES	Stephan	CLINIQUE DE NEUROCHIRURGIE	CHU
CHABRE	Olivier	CLINIQUE ENDOCRINO DIABETO NUTRITION EDUCATION THERAPEUTIQUE/ENDOCRINOLOGI E PÔLE 6 DIGIDUNE	CHU
CHAFFANJON	Philippe	CLINIQUE CHIRURGIE THORACIQUE, VASCULAIRE ET ENDOCRINIENNE	CHU
CHAVANON	Olivier	CLINIQUE DE CHIRURGIE CARDIAQUE PÔLE 4 CARDIO VASC. & THORACIQUE	CHU
CHIQUET	Christophe	CLINIQUE OPHTALMOLOGIQUE PÔLE 3 TÊTE & COU & CHIR. REPARATRICE	CHU
CHIROSEL	Jean-Paul	ANATOMIE PÔLE 3 TÊTE & COU & CHIR. REPARATRICE	FACULTE
CINQUIN	Philippe	DPT D'INNOVATIONS TECHNOLOGIQUES PÔLE 17 SANTE PUBLIQUE	CHU
COHEN	Olivier	DELEGATION - HC FORUM (Création entreprise) - rémunération universitaire conservée	
COUTURIER	Pascal	CLINIQUE MEDECINE GERIATRIQUE PÔLE 8 PLURIDISCIPLINAIRE DE MEDECINE	CHU
CRACOWSKI	Jean-Luc	LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE	CHU
DE GAUDEMARIS	Régis	DPT MEDECINE & SANTE DU TRAVAIL PÔLE 17 SANTE PUBLIQUE	CHU
DEBILLON	Thierry	CLINIQUE REA. & MEDECINE NEONATALE PÔLE COUPLE/ENFANT	CHU
DEMATTEIS	Maurice	CLINIQUE DE MEDECINE LEGALE	CHU
DEMONGEOT	Jacques	BIostatistiques ET INFORMATIQUE MEDICALE POLE 17 SANTE PUBLIQUE	CHU
DESCOTES	Jean-Luc	CLINIQUE UROLOGIE PÔLE 6 DIGIDUNE	CHU

Nom	PRENOM	ADRESSE 1	ADRESSE 2
ESTEVE	François	Dir. Equipe 6 U836 - ID17 /ESRF Grenoble Institut des Neurosciences	Bat Edmond SAFRA
FAGRET	Daniel	CLINIQUE DE MEDECINE NUCLEAIRE PÔLE 13 IMAGERIE	CHU
FAUCHERON	Jean-Luc	CLINIQUE DE CHIRURGIE DIGESTIVE ET DE L'URGENCE PÔLE 6 DIGIDUNE	CHU
FAVROT	Marie- Christine	DPT DE BIOLOGIE INTEGREE / CANCEROLOGIE PÔLE 14 BIOLOGIE	CHU
FERRETTI	Gilbert	CLINIQUE RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE PÔLE 13 IMAGERIE	CHU
FEUERSTEIN	Claude	GIN	Bat Edmond SAFRA
FONTAINE	Eric	CLINIQUE NUTRITION ARTIFICIELLE PÔLE 7 MED. AIGÛE & COMMUNAUTAIRE	CHU
FRANCOIS	Patrice	DPT DE VEILLE SANITAIRE PÔLE 17 SANTE PUBLIQUE	CHU
GARNIER	Philippe		
GAUDIN	Philippe	CLINIQUE DE RHUMATOLOGIE PÔLE 11 APPAREIL LOCOMOTEUR GERIATRIE CHISSE	CHU
GAY	Emmanuel	CLINIQUE NEUROCHIRURGIE PÔLE 3 TÊTE & COU & CHIR. REPARATRICE	CHU
GRIFFET	Jacques	CHIRURGIE INFANTILE	CHU
HALIMI	Serge	CLINIQUE ENDOCRINO-DIABETO- NUTRITION PÔLE 6 DIGIDUNE	CHU
HOMMEL	Marc	CLINIQUE DE NEUROLOGIE PÔLE 10 PSYCHIATRIE & NEUROLOGIE	CHU
JOUK	Pierre-Simon	DEPARTEMENT GENETIQUE ET PROCREATION PÔLE 9 COUPLE/ENFANT	CHU
JUVIN	Robert	CLINIQUE DE RHUMATOLOGIE PÔLE 11 APPAREIL LOCOMOTEUR GERIATRIE CHISSE	HOPITAL SUD
KAHANE	Philippe	CLINIQUE DE NEUROLOGIE PÔLE 10 PSYCHIATRIE & NEUROLOGIE	CHU
KRACK	Paul	CLINIQUE DE NEUROLOGIE PÔLE 10 PSYCHIATRIE & NEUROLOGIE	CHU
KRAINIK	Alexandre	CLINIQUE NEURORADIOLOGIE & IRM Pôle 13 IMAGERIE	CHU
LANTUEJOUL	Sylvie	DEPARTEMENT D'ANATOMIE & CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES PÔLE 14 BIOLOGIE	CHU
LE BAS	Jean-François	CLINIQUE NEURORADIOLOGIE & IRM Pôle 13 IMAGERIE	CHU

Nom	PRENOM	ADRESSE 1	ADRESSE 2
LEBEAU	Jacques	CLINIQUE CHIR. MAXILLO-FACIALE PÔLE 3 TÊTE & COU & CHIR. REPARATRICE	CHU
LECCIA	Marie- Thérèse	CLINIQUE DERMATOLOGIE- VENEROLOGIE PHOTOBIOLOGIE ET ALLERGOLOGIE PÔLE 8 PLURIDISCIPLINAIRE DE MEDECINE	CHU
LEROUX	Dominique	DEPARTEMENT BIOLOGIE & PATHOLOGIE DE LA CELLULE PÔLE 14 BIOLOGIE	CHU
LEROY	Vincent	CLINIQUE HEPATO-GASTRO- ENTEROLOGIE PÔLE 6 DIGIDUNE	CHU
LETOUBLON	Christian	CLINIQUE CHIRURGIE DIGESTIVE & URGENCE PÔLE 6 DIGIDUNE	CHU
LEVERVE	Xavier	LABORATOIRE THERAPEUTIQUE UFR BIOLOGIE BAT 72 UJF BP 53X	38041 GRENOBLE CEDEX 1
LEVY	Patrick	PHYSIOLOGIE PÔLE 12 REEDUCATION & PHYSIOLOGIE	CHU
LINARDI	Joël	BIOCHIMIE ADN PÔLE 9 COUPLE/ENFANT	CHU
MACHECOURT	Jacques	CLINIQUE DE CARDIOLOGIE PÔLE 4 CARDIO VASC. & THORACIQUE	CHU
MAGNE	Jean-Luc	CLINIQUE CHIRURGIE VASCULAIRE & THORACIQUE PÔLE 4 CARDIO VASC. & THORACIQUE	CHU
MAITRE	Anne	Médecine du travail EPSP/DPT DE BIOLOGIE INTEGREE PÔLE 14 BIOLOGIE	J. ROGET FACULTE 4E ETAGE
MASSOT	Christian	CLINIQUE MEDECINE INTERNE PÔLE 8 PLURIDISCIPLINAIRE DE MEDECINE	CHU
MAURIN	Max	DEPARTEMENT DES AGENTS INFECTIEUX / BACTERIOLOGIE PÔLE 14 BIOLOGIE	CHU
MERLOZ	Philippe	CLINIQUE CHIR. ORTHOPEDIE TRAUMATOLOGIE PÔLE 3 TÊTE & COU & CHIR.REPARATRICE	CHU
MORAND	Patrice	DPT DES AGENTS INFECTIEUX / VIROLOGIE PÔLE 14 BIOLOGIE	CHU
MORO-SIBILOT	Denis	PNEUMOLOGIE PHTISIOLOGIE BUREAU HD11	CHU
MOUSSEAU	Mireille	ONCOLOGIE MEDICALE PÔLE 5 CANCEROLOGIE	CHU
MOUTET	François	CHIR. PLASTIQUE ET RECONSTRUCTRICE ET ESTHETIQUE	CHU
PASSAGIA	Jean-Guy	ANATOMIE PÔLE 3 TÊTE & COU & CHIR. REPARATRICE	CHU

Nom	PRENOM	ADRESSE 1	ADRESSE 2
PAYEN DE LA GARANDERIE	Jean-François	CLINIQUE REANIMATION PÔLE 2 ANESTHESIE-REANIMATION	CHU
PELLOUX	Hervé	DEPARTEMENT DES AGENTS INFECTIEUX / PARACITOLOGIE ET MYCOLOGIE PÔLE 14 BIOLOGIE	CHU
PEPIN	Jean-Louis	CLINIQUE PHYSIOLOGIE SOMMEIL & EXERCICE PÔLE 12 REEDUCATION & PHYSIOLOGIE	CHU
PERENNOU	Dominique	CLINIQUE MPR PÔLE 12 REEDUCATION & PHYSIOLOGIE	CHU
PERNOD	Gilles	CLINIQUE DE MEDECINE VASCULAIRE PÔLE 8 PLURIDISCIPLINAIRE DE MEDECINE	CHU
PIOLAT	Christian	CLINIQUE DE CHIRURGIE INFANTILE	CHU
PISON	Christophe	CLINIQUE PNEUMOLOGIE PÔLE 7 MEDECINE AIGUË & COMMUNAUTAIRE	CHU
PLANTAZ	Dominique	CLINIQUE MEDICALE PEDIATRIQUE PÔLE 9 COUPLE / ENFANT	CHU
POLACK	Benoît	DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PATHOLOGIE DE LA CELLULE PÔLE 14 BIOLOGIE	CHU
POLLAK	Pierre	NEUROLOGIE PÔLE 10 PSYCHIATRIE & NEUROLOGIE	CHU
PONS	Jean-Claude	CLINIQUE UNIVERSITAIRE GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE PÔLE 9 COUPLE / ENFANT	CHU
RAMBEAUD	Jean-Jacques	CLINIQUE UROLOGIE PÔLE 6 DIGIDUNE	CHU
REYT	Emile	CLINIQUE O.R.L. PÔLE 3 TÊTE ET COU ET CHIR. REPARATRICE	CHU
RIGHINI	Christian	CLINIQUE O.R.L. PÔLE 3 TÊTE & COU & CHIR. REPARATRICE	CHU
ROMANET	Jean-Paul	CLINIQUE OPHTALMOLOGIQUE PÔLE 3 TÊTE & COU & CHIR. REPARATRICE	CHU
SARAGAGLIA	Dominique	CLINIQUE ORTHOPEDIQUE & TRAUMATOLOGIE PÔLE 11 APPAREIL LOCOMOTEUR & GERIATRIE CHISSE	HOPITAL SUD
SCHAAL	Jean-Patrick	CLINIQUE UNIVERSITAIRE GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE PÔLE 9 COUPLE / ENFANT	CHU
SCHMERBER	Sébastien	CLINIQUE O.R.L. PÔLE 3 TÊTE & COU & CHIR. REPARATRICE	CHU
SEIGNEURIN	Daniel	DPT ANATOMIE & CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES PÔLE 14 BIOLOGIE	CHU
SELE	Bernard	DPT GENETIQUE & PROCREATION PÔLE 9 COUPLE / ENFANT	CHU

Nom	PRENOM	ADRESSE 1	ADRESSE 2
SESSA	Carmine	CHIRURGIE THORACIQUE VASCULAIRE PÔLE 4 CARDIO VASC. & THORACIQUE	CHU
STAHL	Jean-Paul	CLINIQUE INFECTIOLOGIE PÔLE 7 MEDECINE AIGÛE ET COMMUNAUTAIRE	CHU
TIMSIT	Jean-François	CLINIQUE REANIMATION MEDICALE POLE 7 MED. AIGÛE & COMMUNAUTAIRE	CHU
TONETTI	Jérôme	CLINIQUE ORTHOPEDIQUE & TRAUMATOLOGIE PÔLE 11 APPAREIL LOCOMOTEUR & GERIATRIE CHISSE	CHU
TOUSSAINT	Bertrand	BIOCHIMIE & BIOLOGIE MOLECULAIRE PÔLE 14 BIOLOGIE	CHU
VANZETTO	Gérald	CLINIQUE DE CARDIOLOGIE PÔLE 4 CARDIO VASC. & THORACIQUE	CHU
VUILLEZ	Jean-Philippe	BIOPHYSIQUE & TRAITEMENT DE L'IMAGE	CHU
ZAOUI	Philippe	CLINIQUE NEPHROLOGIE PÔLE 6 DIGILUNE	CHU
ZARSKI	Jean-Pierre	CLINIQUE HEPATO-GASTRO- ENTEROLOGIE PÔLE 6 DIGIDUNE	CHU
BLIN	Dominique		CHU
BOLLA	Michel		CHU
GARNIER	Philippe		CHU
MOREL	Françoise		CHU
SEIGNEURIN	Jean-Marie		CHU

Liste des maitres de conférences des universités – Praticiens hospitaliers au 01/09/2010

Nom	PRENOM	LOCALISATION HOSPITALIERE		ADRESSE 1	ADRESSE 2
BOTTARI	Serge	Biologie Cellulaire	CHU	Laboratoire de bioénergétique INSERM U884	BP 53 38041 GRENOBLE CEDEX 9
BOUTONNAT	Jean	Département de Biologie et Pathologie de la Cellule - Pôle 14 Biologie	CHU	Département de Biologie et Pathologie de la Cellule - Pôle 14 Biologie	CHU
BRENIER-PINCHART	M.Pierre	Parasitologie	CHU	Département des agents infectieux Parasitologie Mycologie Pôle 14: Biologie	CHU
BRICAULT	Ivan	Radiologie et imagerie médicale	CHU	Clinique de radiologie et imagerie médicale Pôle 13: Imagerie	CHU
BRIOT	Raphaël	Départ. De Cancérologie et d'Hématologie	CHU	Pôle Urgence SAMU	CHU
CALLANAN-WILSON	Mary	Génétique	IAB	Génétique	IAB
CROIZE	Jacques	Bactériologie-Virologie	CHU	Département des agents infectieux Microbiovigilance Pôle 14: Biologie	CHU
DERANSART	Colin	Neurologie LAPSEN	UFR BIOLOGIE	GIN Equipe 9	Bâtiment E. SAFRA
DETANTE	Olivier	Cancérologie et hématologie - Pôle 5 Cancérologie	CHU	Clinique de Neurologie	CHU
DUMESTRE-PERARD	Chantal	Immunologie SUD	CHU	Immunologie	Bâtiment J. ROGET
EYSSERIC	Hélène	Médecine Légale	CHU	Clinique de Médecine Légale Pôle 8: Pôle Pluridisciplinaire de Médecine	CHU
FAURE	Anne-Karen	Département de génétique et procréation	CHU	Biologie de la procréation / CECOS Département Génétique et procréation Pôle 9: Couple / enfant	CHU
FAURE	Julien			Département génétique et procréation Pôle 9: Couple / enfant	CHU
GARBAN	Frédéric	Unité Clinique thérapie cellulaire - Pôle 5: Cancérologie	CHU	Unité Clinique thérapie cellulaire - Pôle 5: Cancérologie	CHU
GAVAZZI	Gaëtan	Médecine interne gériatrique Pôle 8: pôle pluridisciplinaire de Médecine	CHU	Clinique médecine interne gériatrique Pôle 8: pôle pluridisciplinaire de Médecine	CHU
GILLOIS	Pierre	information et informatique Médicale	CHU	Laboratoire TIMC	CHU
GRAND	Sylvie	Radiologie et imagerie médicale (I.R.M)	CHU	Clinique de radiologie et imagerie médicale Pôle 13: Imagerie	CHU

Nom	PRENOM	LOCALISATION HOSPITALIERE		ADRESSE 1	ADRESSE 2
HENNEBICQ	Sylviane	Biologie du développement et de la reproduction	CHU	Biologie de la procréation / CECOS Département Génétique et procréation Pôle 9: Couple / enfant	CHU
HOFFMANN	Pascale	Gynécologie Obstétrique	CHU	Clinique Universitaire Gynécologie Obstétrique Pôle 9: Couple / enfant	CHU
JACQUOT	Claude	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale	CHU	Clinique d'Anesthésie Pôle 2: Anesthésie - Réanimations	CHU
LABARERE	José	Dpt de veille sanitaire	CHU	Département de veille sanitaire Pôle 17: Santé Publique	CHU
LAPORTE	François	Pathologie Cellulaire - Pôle 14: Biologie	CHU	Département de Biologie intégrée Pôle 14: Biologie	CHU
LARDY	Bernard	Laboratoire d'enzymologie - 6e étage	CHU	Département de Biologie et Pathologie de la Cellule - Laboratoire d'Enzymologie Pôle 14: Biologie	CHU
LARRAT	Sylvie	Biochimie et Biologie Moléculaire	CHU	Département des agents infectieux Pôle 14: Biologie	CHU
LAUNOIS-ROLLINAT	Sandrine	Lab. explor. Fonct. Cardiorespiratoires	CHU	Clinique de Physiologie sommeil et exercice Lab. Explor. Fonct. cardio-respiratoires Pôle 12: Rééducation et physiologie	CHU
MALLARET	Marie-Reine	Epidémiologie, économie de la Santé (Mal. Inf.)	CHU	Unité d'Hygiène Hospitalière Pavillon E	CHU
MAUBON	Danièle	Département des agents infectieux Parasitologie - Mycologie	CHU	Département des agents infectieux Parasitologie - Mycologie	CHU
MOREAU-GAUDRY	Alexandre		CHU	Département d'innovations technologiques Pôle 17: Santé Publique	CHU
MOUCHET	Patrick	Physiologie	CHU	Clinique de Physiologie sommeil et exercice Lab. Explor. Fonct. cardio-respiratoires Pôle 12: Rééducation et physiologie	CHU
PACLET	Marie-Hélène	Biochimie et Biologie Moléculaire	CHU	Département de Biologie et Pathologie de la Cellule - Laboratoire d'Enzymologie Pôle 14: Biologie	CHU
PALOMBI	Olivier	Clinique de Neurochirurgie	CHU	Clinique de neurologie Pôle 3: Tete et cou et chirurgie réparatrice	CHU
PASQUIER	Dominique	UM Ana. Path. 4 - Pôle 14: Biologie	CHU	Département d'anatomie et cytologie pathologiques Pôle 14: Biologie	CHU
PELLETIER	Laurent	Biologie Cellulaire	CHU	Centre d'innovation biologique	CHU

Nom	PRENOM	LOCALISATION HOSPITALIERE		ADRESSE 1	ADRESSE 2
PAYSANT	François			Clinique de Médecine Légale Pôle 8: Pôle Pluridisciplinaire de Médecine	CHU
RAY	Pierre	Génétique BDR	CHU	Biologie de la reproduction Département génétique et procréation Pôle 9: Couple / Enfant	CHU
RENVERSEZ	Jean-Charles	Biochimie et Biologie Moléculaire Pôle 14: Biologie	CHU	Département de Biologie intégrée Biochimie et Biologie Moléculaire Pôle 14: Biologie	CHU
RIALLE	Vincent	information et informatique Médicale	CHU	Laboratoire TIMC	La Tronche
SATRE	Véronique	Génétique chromosomique	CHU	Génétique chromosomique Département génétique et procréation Pôle 9: Couple / enfant	CHU
STANKE-LABESQUE	Françoise	Laboratoire de Pharmacologie	CHU	Laboratoire de Pharmacologie	CHU
STASIA	Marie-Josée	UM diagnostic & Recherche granulomatose septique - Pôle 14: Biologie	CHU	Département de biologie et pathologie de la cellule Pôle 14: Biologie	CHU
TAMISIER	Renaud	Physiologie	CHU	Clinique de Physiologie sommeil et exercice Lab. Explor. Fonct. cardio-respiratoires Pôle 12: Rééducation et physiologie	CHU
WEIL	Georges	Biostatistiques et Informatique Médicales	CHU	Biostatistiques et Informatique Médicale Pôle 17: Santé Publique	CHU

Remerciements

A Monsieur le Professeur Jean-François Payen,

Pour me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Je vous remercie de m'avoir proposé de réaliser un master recherche, ce fut une année enrichissante et cette thèse est en quelque sorte son aboutissement. Merci pour votre disponibilité, votre soutien et votre dynamisme. Veuillez trouver ici ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Gilles Francony, directeur de thèse,

Un grand merci pour ton aide, ta disponibilité, ta compétence et ta gentillesse légendaires. Avec Régine, vous m'avez aidée pour mes premières manips, appris les règles de l'expérimentation animale (sans oublier l'indispensable ode au rat lors de la montée des drapeaux « O ratibus...»). A l'hôpital, j'ai eu la chance de t'avoir comme chef de pique-nique dans mes débuts en réanimation (j'ai toujours le welcome pack URC !) et de profiter ensuite tout au long de mon internat de ton apprentissage. Enfin, merci pour ton aide pour cette thèse (relecture et remarques précieuses). Tu peux souffler, je ne viendrai plus te demander tous les jours : « Gilles, as-tu eu le temps de relire ma thèse ? » entre les gardes, astreintes...

A Monsieur le Professeur Albaladejo,

Pour me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse et d'avoir accepté de juger mon travail. Encore une thèse de neuro., penserez-vous, peut-être mais vous n'êtes pas sans savoir que l'EPO serait également intéressante pour le cœur ! Je vous remercie pour votre disponibilité, votre dynamisme. J'aurai bientôt la chance de pouvoir retravailler avec vous.

A Monsieur le Professeur Gay,

Pour me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse et d'avoir accepté de juger mon travail. J'espère que celui-ci vous intéressera.

A Monsieur le Docteur Bouzat,

Merci de me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse et de juger mon travail. Merci pour tes passages au labo. pour l'avancée des manip., pour ton aide, ta bonne humeur, tes blagues... (Malo...). J'allais oublier : pense à ton béret basque et à ton bâton de berger pour la fin de l'année place notre Dame !

Merci à Samuel Valable et Myriam Bernaudin et leur équipe CERVOxy de Caen pour la réalisation du versant biologie moléculaire, sans vous cette étude n'aurait pu aboutir.

A ma famille,

A mes parents, Maman, Papa, merci pour votre indéfectible soutien. Après 12 ans d'études, cette fois-ci, c'est la fin ! Vous m'avez toujours encouragée (« Force et courage »), et surtout m'avez transmis les valeurs indispensables pour la vie. Je vous aime.

A mes grands-parents, de là-haut, puissiez-vous être fiers et contents.

A mes frérots, Matthieu et Etienne, vous aussi m'avez bien aidée pour mon master : j'ai pu dériver sans sombrer même si, désolée Matthieu, ce n'était pas la rigueur mathématique mais l'approximation physique ! Toujours là pour les moments difficiles mais aussi pour les bons (vive la montagne !). Vous êtes en train de prendre votre envol, donc bon vent !

A ma marraine,

Merci pour ce suivi de ma vie malgré la distance, pour tes connaissances médicales encyclopédiques, tes longs coups de fil bienfaiteurs. Un petit clin d'œil se trouve dans la figure 11.

A Madame le Docteur Jacquot, vous m'avez accompagnée tout au long de mon internat, finalement l'ancienne lyonnaise n'était pas complètement perdue ! Je vous souhaite une retraite heureuse et active.

A l'équipe « URClenne », merci pour ces 6 ans entre stages et gardes. Merci Pierre, Dominique, Marie-Christine, Christophe, Jérôme, Julien, Pierre, pour votre enseignement, votre dynamisme, votre bonne humeur, votre soutien et votre disponibilité dans les moments un peu plus difficiles. Vous m'avez donné un surnom tenace ! mais vous êtes pardonnés car vous m'avez tant appris. Merci aussi à l'équipe paramédicale entre IDE, AS et kiné. Une page se tourne.

A l'équipe de la réa 9, en particulier à Michel et Joël, merci pour votre compétence et votre accueil passé et présent. Je suis honorée de bientôt faire partie de votre équipe.

A l'ensemble des médecins et personnels soignants que j'ai pu côtoyer au cours de mon internat. Entre stages d'anesthésie et de réanimation ou au DCA, sur Grenoble ou sur Annecy. Pour certains plus que des collègues, vous êtes devenus des amis. Merci pour votre enseignement, votre souci permanent du patient.

A l'équipe 5 du GIN, merci pour mon année de master. Mention spéciale à Régine pour ton aide précieuse pour les manips, aux différents aides pour les traumatismes... (Anaïck, Franck, Sébastien), à mes copines de bureau (Anaïck, Audrey).

A mes amis,

Bien évidemment à mes co-internes de promo, et à leur compagne : Sébastien, Anne-Laure et petit Paul, Samuel et Estelle, les anciens de Lyon, Clément et Lucie, Serge. Merci pour ces soirées, parfois un peu trop anesthésiques pour nos amies les psychiatres, ces WE montagne !

Aux amis des autres promos en particulier à Karine et Marine, Evodie.

A mes amis Lyonnais avec qui j'ai partagé mes premières années de médecine, notamment Laurence, Caroline, Aurélie, Magali, Anne-Sophie, Elodie. Je vous souhaite plein de bonheur avec vos petites familles qui s'agrandissent. Enfin, je vais, à mon tour être thésée !

A Irène, rendez-vous pour d'autres randonnées ; à Delphine, pour nos interminables discussions au cours de nos études respectives !

Rôle des voies de signalisation de deux protéines kinases, Erk et Akt, dans l'effet anti-œdémateux de l'érythropoïétine

Ce travail a été réalisé dans le cadre du master recherche intitulé : « Master Sciences, Technologies, Santé à finalité Recherche Mention Ingénieries pour la santé et le médicament spécialité Modèles, Images et Instruments en médecine et biologie » (UJF Grenoble).

Table des matières

Liste des abréviations	1
Résumé	2
Abstract	3
Partie 1 : Introduction	4
Partie 2 : Matériels et méthodes	
1. Animaux	8
2. Préparation des animaux et protocole expérimental	8
3. Les inhibiteurs de Erk et Akt	9
4. La rhEPO : Erythropoïétine humaine recombinante	9
5. Le traumatisme crânien	9
6. Mesures biochimiques de l'effet de l'EPO à H+1	10
7. Quantification de l'œdème cérébral par gravimétrie	11
8. Analyse statistique des résultats	12
9. Schéma de l'étude	13
Partie 3 : Résultats	
1. Validation du modèle avec injection intraventriculaire	14
2. Vérification de l'inhibition de la phosphorylation de Erk et Akt par U0126 et LY294,002	16
3. Implication de Erk dans l'effet antiœdémateux de l'EPO	17
4. Rôle de Akt dans l'effet anti-œdémateux précoce de l'EPO	18
Partie 4 : Conclusion – Discussion	19
Conclusion de thèse	22
Bibliographie	25

Abréviations

Akt (PI3-K / Akt) : voie du phosphatidylinositol 3 kinase / Akt

AVC : accident vasculaire cérébral

BHE : barrière hématoencéphalique

BWC : brain water contain

CEPO : érythropoïétine carbamylée

DS : déviation standard

DMSO : diméthylsulfoxyde

EPO : érythropoïétine

Erk : extracellular regulated kinase

EtCO₂ : fraction expirée en CO₂

FDA : Food and Drug Administration

GA : gauge

JAK : Janus kinase

KCL : chlorure de potassium

MAPKinase: mitogen activated protein kinase

MO : microscopie optique

OC : œdème cérébral

PIC : pression intracrânienne

rhEPO : érythropoïétine humaine recombinante

SNC : système nerveux central

SpGr : gravité spécifique (d'un échantillon)

TBI : traumatic brain injury

TC : traumatisme crânien

Résumé

Notre équipe avait montré que l'érythropoïétine (EPO) diminuait significativement l'œdème cérébral (OC) des rats soumis à un traumatisme crânien diffus (TC). Cette diminution était accompagnée de modifications intracérébrales précoces de phosphorylation des protéines kinases Erk et Akt. Dans cette étude, nous avons tenté de mettre en évidence un lien causal entre les modifications de phosphorylation observées et la diminution de l'œdème cérébral, par inhibition de ces protéines kinases. Afin d'inhiber Erk et Akt directement en intracérébral, un modèle d'injection intracérébroventriculaire a été validé par injection intracérébrale d'encre de Chine et visualisation en microscopie optique. L'inhibiteur de Erk, U0126 ou d'Akt, LY294,002 ont été injectés juste avant le traumatisme crânien. L'EPO (5 000 UI/kg) a été administrée par voie intraveineuse 30 minutes après le TC. La phosphorylation des protéines kinases était mesurée à 1 heure (H1) et l'œdème cérébral était évalué par gravimétrie à 2 heures (H2). L'inhibition de Akt n'a pas modifié l'OC post-TC et l'administration d'EPO est demeurée sur l'OC. Akt ne semble donc pas jouer de rôle dans l'effet anti-œdémateux de l'EPO. Après inhibition de Erk, la diminution de l'OC a été comparable à celle observée avec l'EPO sans effet additif. Ces données suggèrent que l'effet anti-œdémateux cérébral de l'EPO après TC diffus pourrait être médié par l'inhibition précoce de la phosphorylation Erk.

Mots-clefs : Erythropoïétine, Traumatisme crânien, Œdème cérébral, Erk, Akt

Abstract

Our team found that erythropoietin (EPO) significantly reduced the development of brain edema in a rat model of diffuse traumatic brain injury (TBI). This reduction was associated with early changes of brain phosphorylation of two protein kinases, Erk and Akt. In this study, we investigated the possible causal link between phosphorylation changes and brain edema. To specifically inhibit Erk and Akt, we developed a model with intracerebroventricular injection by using intracerebral injection of Indian ink and optical microscopy visualization. The ERK-1/-2 inhibitor, U0126, or the Akt inhibitor, LY294002 were administered before traumatic brain injury. EPO (5,000 IU/kg body weight) was intravenously administered 30 mins after injury brain. Phosphorylation of Erk and Akt was measured 1 hour after insult (H1) and brain water content were measured 2 hours (H2) after insult by gravimetric technique. The inhibition of Akt pathway did not result in significant differences in brain water content (BWC); the addition of post injury treatment with EPO significantly decreased BWC. Inhibition of Erk reduced BWC, no further reduction of brain edema was found when Erk was combined with EPO treatment. These results suggest that the anti-edematous effect of EPO after diffuse TBI could be mediated through an early inhibition of ERK phosphorylation.

Keywords : erythropoietin, Traumatic brain injury, Brain edema, Erk, Akt

Partie 1 : Introduction

La prise en charge du traumatisé crânien représente un véritable enjeu de santé publique. En effet, le traumatisme crânien (TC) représente l'une des premières causes de morbidité et de mortalité chez le sujet jeune. Son incidence annuelle est élevée (estimée à 175 à 200 pour 100 000 habitants aux Etats-Unis)¹. En France, le pronostic de cette affection reste grave avec une mortalité estimée à 52 % et une imputabilité dans plus de 40 % des décès par traumatisme². Parmi les survivants, les séquelles neurologiques sont souvent lourdes chez les traumatisés crâniens sévères pouvant aboutir à un état peu ou non relationnel définitif²

Sur le plan physiopathologique, dans les suites d'un traumatisme crânien, on différencie deux types de lésions neurologiques :

- les lésions primaires, conséquences directes du TC. Ces lésions sont focales ou diffuses. Les lésions axonales et endothéliales diffuses sont responsables d'un coma profond d'emblée.
- les lésions secondaires, liées à des facteurs aggravants d'origine systémique.

Sous l'influence de ces lésions, un œdème cérébral (OC) se développe chez 15 à 30 % des traumatisés crâniens graves³. L'œdème cérébral correspond à une augmentation du contenu en eau intracérébral, il aboutit à une élévation de la pression intracrânienne (PIC). L'hypertension intracrânienne compromet la perfusion et l'oxygénation cérébrales. Le pronostic neurologique du patient dépend donc en grande partie de l'OC via les lésions ischémiques qu'il entraîne. La physiopathologie exacte de la genèse de l'OC n'est pas élucidée. Toutefois, il convient de différencier l'œdème vasogénique de l'œdème cellulaire ou cytotoxique. L'œdème cérébral secondaire au traumatisme crânien est essentiellement de nature cellulaire avec comme son nom l'indique une accumulation d'eau intracellulaire (astrocytes, neurones).

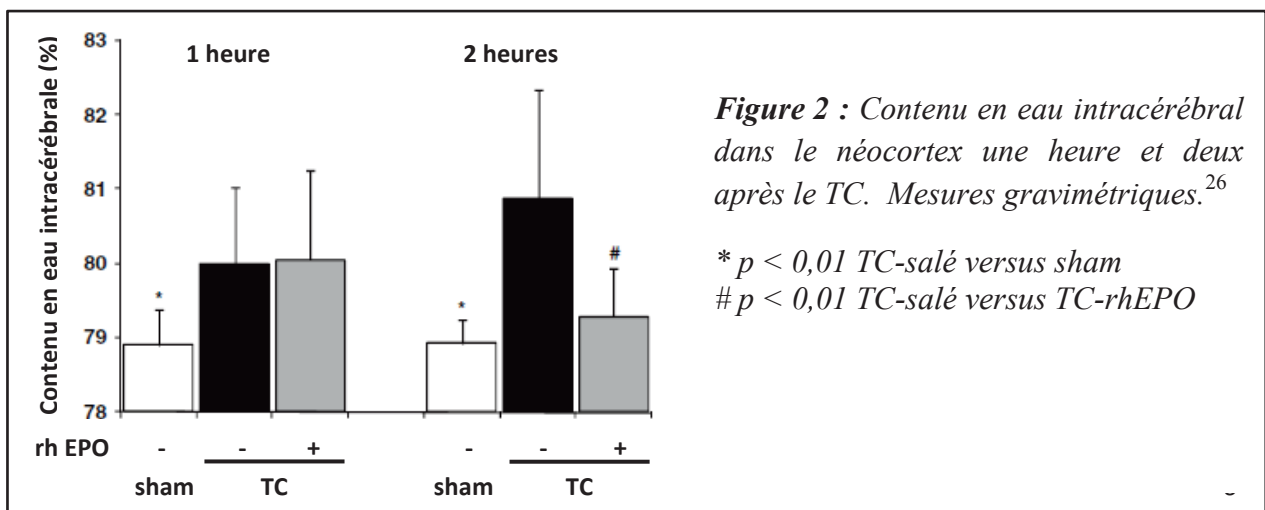
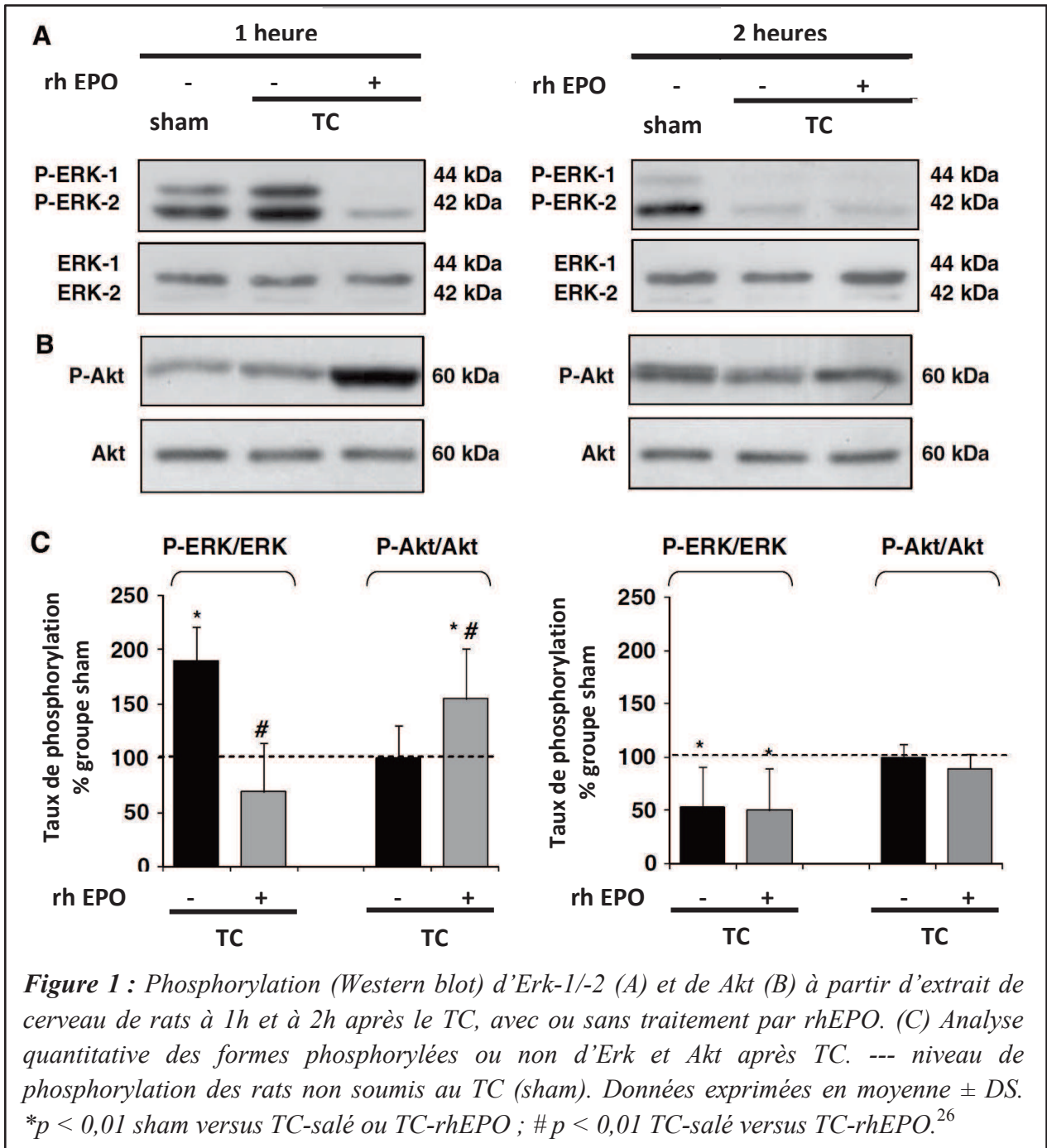
Les thérapeutiques actuelles de prise en charge du traumatisme crânien sont purement symptomatiques. Elles visent à limiter l'apparition de l'ischémie cérébrale en contrôlant l'hypertension intracrânienne. En clinique humaine, aucune thérapeutique n'agit actuellement sur la constitution de l'œdème cérébral. Ainsi, différentes études expérimentales ont étudié de potentiels traitements neuroprotecteurs parmi lesquels l'érythropoïétine (EPO) et un dérivé de l'EPO, l'érythropoïétine carbamylée (CEPO) apparaissent prometteurs.

L'érythropoïétine commence à être de mieux en mieux connue. Cette scialoglycoprotéine de 34kDa exerce non seulement une action érythropoïétique bien connue mais est également pourvue d'un effet histo-cytoprotecteur, et en particulier neuroprotecteur via son tropisme cérébral. En effet, de l'EPO est synthétisée au niveau cérébral et de même, la présence de récepteurs à l'EPO est retrouvée au niveau des différents types cellulaires

(neurones, oligodendrocytes, astrocytes, microglie et cellules endothéliales...)⁴. Les propriétés neuroprotectrices de l'EPO ont été mises en évidence dans plusieurs études expérimentales in vitro et in vivo d'affections du système nerveux central (SNC)^{5,6,7}. Dans un essai clinique portant sur 40 patients atteints d'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique récent, le traitement par EPO réduit la taille du volume infarcté et améliore le devenir fonctionnel⁸. En traumatologie crânienne, essentiellement dans des modèles murins de TC focal, plusieurs publications montrent, après traitement par EPO, une diminution du volume des lésions^{9,10,11,12,13,14} et de l'œdème cérébral^{11,15}, une amélioration des scores neurologiques^{11,12,13,16,17,18}, une réduction de la réaction inflammatoire dans le tissu cérébral^{15,16} et une diminution de l'apoptose^{13,15,16}. Dans un modèle de TC diffus, l'administration d'EPO diminue significativement l'œdème cérébral et ce dès la première heure post-TC¹⁹.

Les voies cellulaires impliquées dans l'effet neuroprotecteur de l'EPO commencent à être explorées. L'EPO, une fois fixée sur un de ses récepteurs, activerait une Janus kinase (JAK2)^{20,21}; celle-ci activerait à son tour plusieurs voies de signalisation intracellulaires parmi lesquelles deux voies sembleraient prépondérantes : la voie du phosphatidylinositol 3 kinase / Akt (PI3-K / Akt) et celle des Mitogen activated protein kinase (MAPKines) avec l'activation de Erk-1/-2 (Extracellular-regulated kinase)²⁰. Rapidement après administration d'EPO, les voies Erk et Akt seraient impliquées ; la part respective de ces deux voies diverge selon les études. Dans des modèles murins de TC focal, deux études^{22,23} rapportent une réduction du volume des lésions après inhibition de Erk. Pour d'autres équipes, la voie Akt serait d'avantage impliquée dans la neuroprotection²⁴ ou alors l'activation des deux voies serait nécessaire à l'action neuroprotectrice de l'EPO²⁵.

Antérieurement, notre équipe s'était intéressée à l'association possible entre les effets anti-œdémateux précoces de l'EPO et les modifications d'activation de ces protéines kinases dans un modèle de TC diffus chez le rat. En effet, aucune donnée n'existait jusqu'à présent sur l'implication de ces deux protéines kinases dans le TC diffus. Une heure après le TC (H+1), on notait une augmentation de la phosphorylation de Erk ; après traitement par EPO, la forme phosphorylée soit activée de Erk était au contraire diminuée. A H+1, Akt n'était pas significativement modifiée ; en revanche, après traitement par EPO, la phosphorylation d'Akt était significativement augmentée. Ces variations étaient donc retrouvées très précocement à savoir dès la première heure post-TC et ne l'étaient plus dès H+2 (*figure 1*). Parallèlement, le traitement par EPO diminuait significativement le contenu en eau intracérébral dès H+2 (*figure 2*). Ces observations suggèrent donc un lien entre la modulation des voies Erk et Akt et l'action antiœdémateuse de l'EPO.



L'objectif principal de l'étude a donc été de mettre en évidence, dans un modèle de TC diffus chez le rat, une éventuelle relation de causalité entre l'EPO, la modulation des voies Erk et Akt, et l'œdème cérébral.

Pour établir ce lien éventuel, l'inhibition de Erk et d'Akt a été nécessaire. Afin de s'assurer d'une action spécifiquement intracérébrale de ces inhibiteurs, leur injection intracérébrale a été nécessaire. En effet, nous connaissions peu la diffusion à travers la barrière hématoencéphalique des inhibiteurs et nous souhaitons nous amender de potentiels effets systémiques des inhibiteurs.

Ainsi, les objectifs préalables de l'étude mais néanmoins indispensables pour répondre à l'objectif principal ont été :

- la mise au point d'un modèle d'injection intracérébrale chez le rat mâle Wistar
- et sa validation dans notre modèle de TC diffus.

Partie 2 : Matériels et méthodes

1. Animaux

Dans notre protocole expérimental, des rats mâles Wistar (300-450g) ont été utilisés dans le respect des règles éthiques de l'expérimentation animale.

L'expérimentation a été réalisée en deux phases :

- Une première phase préparatoire (n=15 rats) de mise au point et validation d'un modèle d'injection intracérébroventriculaire.
- Une deuxième phase répondant plus spécifiquement à notre problématique, et comportant deux séries d'expérience :
 - Dans la première série (n=30 rats), une heure après le TC (H+1), les effets biochimiques immédiats de la rhEPO, des inhibiteurs de Erk et Akt sur les protéines kinases Erk et Akt ont été étudiés (Phosphorylation).
 - Dans la deuxième série (n=30 rats), deux heures après le TC (H+2), les effets biochimiques immédiats de la rhEPO, des inhibiteurs de Erk et Akt sur le contenu en eau intracérébral ont été analysés.
 - Les animaux ont été divisés en 6 groupes :
 - Groupe TC-placebo-salé : rats traumatisés ne recevant aucun inhibiteur et recevant du sérum physiologique
 - Groupe TC-placebo-EPO : rats traumatisés ne recevant aucun inhibiteur et traités par EPO
 - Groupe TC-inh Erk-salé : rats traumatisés recevant l'inhibiteur de Erk et recevant du sérum physiologique
 - Groupe TC-inh Erk-EPO : rats traumatisés recevant l'inhibiteur de Erk et traités par EPO
 - Groupe TC-inh Akt-salé : rats traumatisés recevant l'inhibiteur de Akt et recevant du sérum physiologique
 - Groupe TC-inh Akt-EPO : rats traumatisés recevant l'inhibiteur de Akt et traités par EPO

2. Préparation des animaux et protocole expérimental

Dans une cage d'induction, le rat a été anesthésié avec de l'isoflurane. Il a ensuite été intubé à l'aide d'un cathéter de 14 GA (Gauge), ventilé mécaniquement avec un respirateur dédié (SAR-830/P, CWE Inc, Ardmore, PA, USA ; paramètres du respirateur : FR 60/min,

I/E : 1/1, mélange 60% air/ 40% oxygène). L'isoflurane a été utilisé pour l'entretien de l'anesthésie.

L'animal a ensuite été placé dans un cadre stéréotaxique pour les injections intraventriculaires d'inhibiteurs ou de placebo. (cf. infra).

Puis, une pastille de laiton a été disposée sur le crâne du rat. Elle permet une répartition homogène de l'énergie produite par l'impact sur l'ensemble du crâne et évite toute fracture. Le rat a ensuite subi le traumatisme crânien selon le modèle impact-accélération décrit ci-dessous : repère temporel H0.

Trente minutes après le TC, le rat a reçu par voie intraveineuse soit de la rhEPO soit du sérum physiologique (salé) grâce à un cathéter de 26 GA préalablement posé sur sa queue.

Durant l'expérimentation, deux paramètres ont été particulièrement surveillés : la fraction expirée en CO₂ (EtCO₂), permettant de contrôler la PaCO₂, et la température. La température a été maintenue à 36,5±5°C grâce à une couverture chauffante placée sous l'animal. Les études préalables de l'équipe avaient pu montrer une parfaite stabilité hémodynamique et ventilatoire dès lors que l'EtCO₂ reste stable.

3. Les inhibiteurs de Erk et Akt

Les inhibiteurs de Erk et Akt utilisés ont été respectivement U0126 ethanolate et LY294,002 hydrochloride. (Sigma-Aldrich). Après lecture de la littérature, nous avons déterminé une concentration finale de 0,5 µg/µl soit une dilution à 10% dans du DMSO (diméthylsulfoxyde). Le DMSO correspond au placebo et est le solvant des deux inhibiteurs.

4. La rhEPO : Erythropoïétine recombinante humaine

L'EPO recombinante (Eprex ® 40 000 UI/ml) a été injectée par voie intraveineuse directe 30 minutes après le traumatisme crânien à la dose de 5 000 UI/kg diluée dans 1 ml de sérum physiologique. Les rats non traités ont reçu 1 ml de sérum physiologique.

5. Le traumatisme crânien

Les rats ont subi un traumatisme crânien de type impact-accélération selon le modèle décrit par Marmarou et al²⁷. Ce modèle, contrairement aux modèles de TC isolé, présente l'avantage de se rapprocher de la clinique humaine par son atteinte diffuse responsable d'un œdème cérébral diffus sans fracture du crâne ni contusion hémorragique. Par ailleurs, il a été largement étudié : études histologiques, atteinte neurocomportementale²⁸ et est bien connu de notre équipe.

A travers un tube en plexiglas, une masse métallique de 500 g est lâchée d'une hauteur de 1,5 mètres, elle provoque alors un impact sur le crâne de l'animal via une pastille de laiton

collée sur la voûte crânienne. La tête du rat fait un rapide mouvement de flexion-extension responsable de lésions axonales diffuses et d'un œdème cérébral réactionnel. (Figure 3).

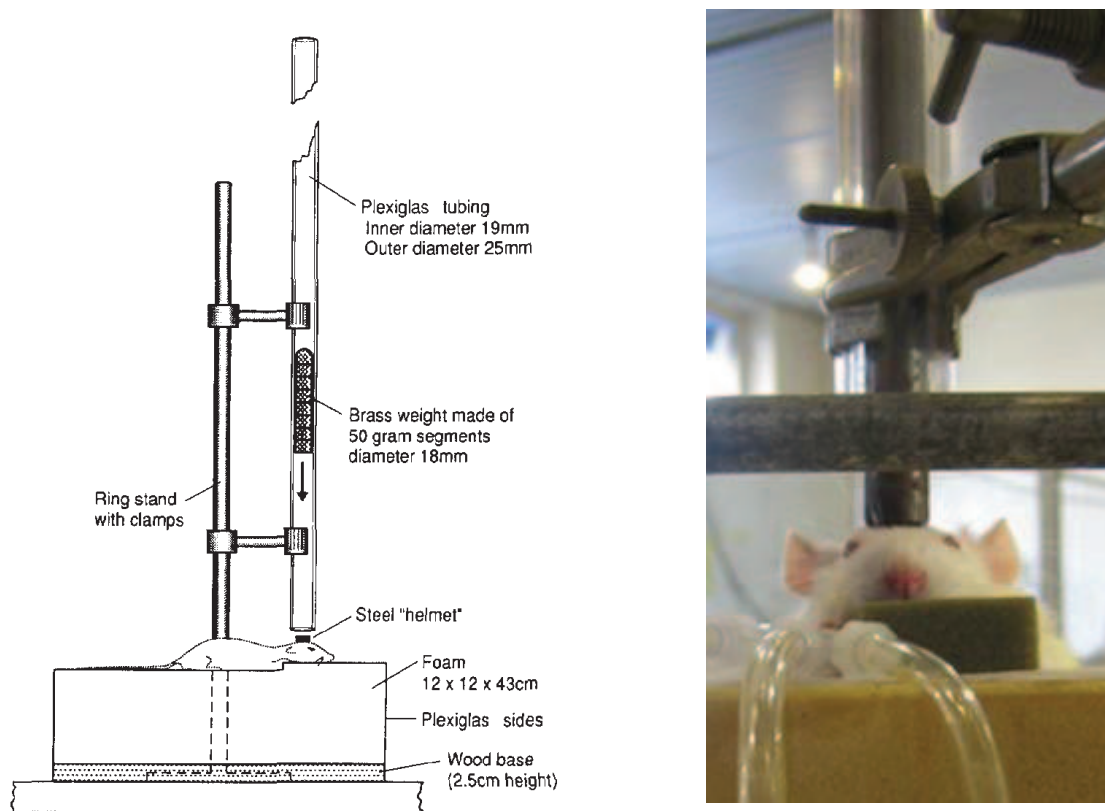


Figure 3 : dispositif expérimental du traumatisme crânien²⁷

6. Mesures biochimiques de l'effet de l'EPO à H + 1

Les protéines kinases Erk et Akt ont été analysées une heure après le TC (H+1), après sacrifice de l'animal par injection de chlorure de potassium. Les deux hémisphères cérébraux ont été prélevés, congelés à - 40°C grâce à une solution d'isopentane puis rapidement stockés à - 80°C et secondairement envoyés à l'équipe CERVOXy de l'UMR 6232 CINAPS de Caen pour Western Blot. (Collaboration avec Samuel Valable et Myriam Bernaudin).

Après homogénéisation des échantillons de cerveau, supplémentation par un mélange d'inhibiteurs de phosphatase et de protéase, la concentration en protéines a été déterminée par mesure colorimétrique. Les protéines ont ensuite été séparées grâce à un gel d'électrophorèse (SDS-polyacrylamide) puis transférées sur une membrane de polyvinylidène difluoride où elles ont été bloquées pendant une heure avec du TTBS-Regilait. Elles ont alors été incubées pendant une nuit à 4°C avec les anticorps anti Phospho-Erk, anti Erk et anti Akt. Enfin, après lavage, les bandes immunoréactives ont été révélées par chimiluminescence.

7. Quantification de l'œdème cérébral par gravimétrie

La microgravimétrie permet la détermination de la gravité spécifique d'échantillons de cerveau et ainsi la détermination du contenu en eau intracérébral à l'aide de la formule de Takagi reprise par Fatouros²⁹ :

$$\% \text{H}_2\text{O} = 462,6 / \text{SpGr} - 362,6$$

avec : - % H₂O : le contenu en eau intracérébral exprimé en pourcentage

- SpGr : la gravité spécifique de l'échantillon de tissu cérébral

Une colonne de gradient a été constituée à l'aide d'un mélange de kérosène et de bromobenzène réalisant ainsi une colonne de densité linéairement croissante du haut vers le bas. L'équation de cette relation linéaire a été retrouvée par étalonnage au moyen de six solutions de densités différentes et connues de sulfate de potassium (K₂SO₄).

Deux heures après le traumatisme crânien H+2, après sacrifice des animaux, les cerveaux ont été découpés en tranche de 2 mm (figure 4) et des biopsies de 2 à 4 mm³ ont été réalisées au niveau du cortex. Ces échantillons ont ensuite été déposés au sommet de la colonne de gravimétrie.



Figure 4 : cerveau de rat et biopsies

Deux minutes après l'immersion, la hauteur d'équilibre des biopsies a été notée ; grâce à l'équation retrouvée lors de l'étalonnage, la gravimétrie spécifique des biopsies a été retrouvée permettant ainsi la détermination du contenu en eau intracérébral. (Figure 5).

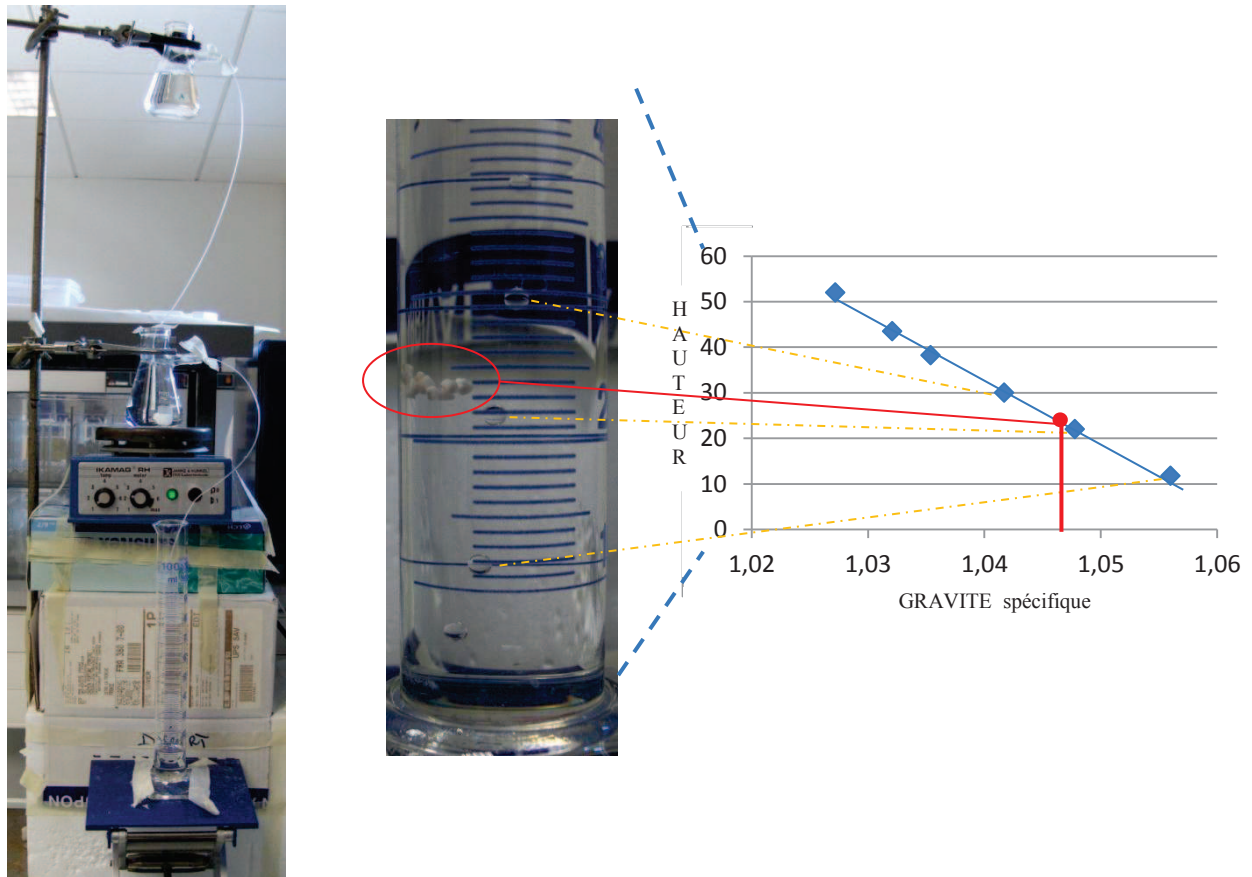


Figure 5 : Colonne de gravimétrie :

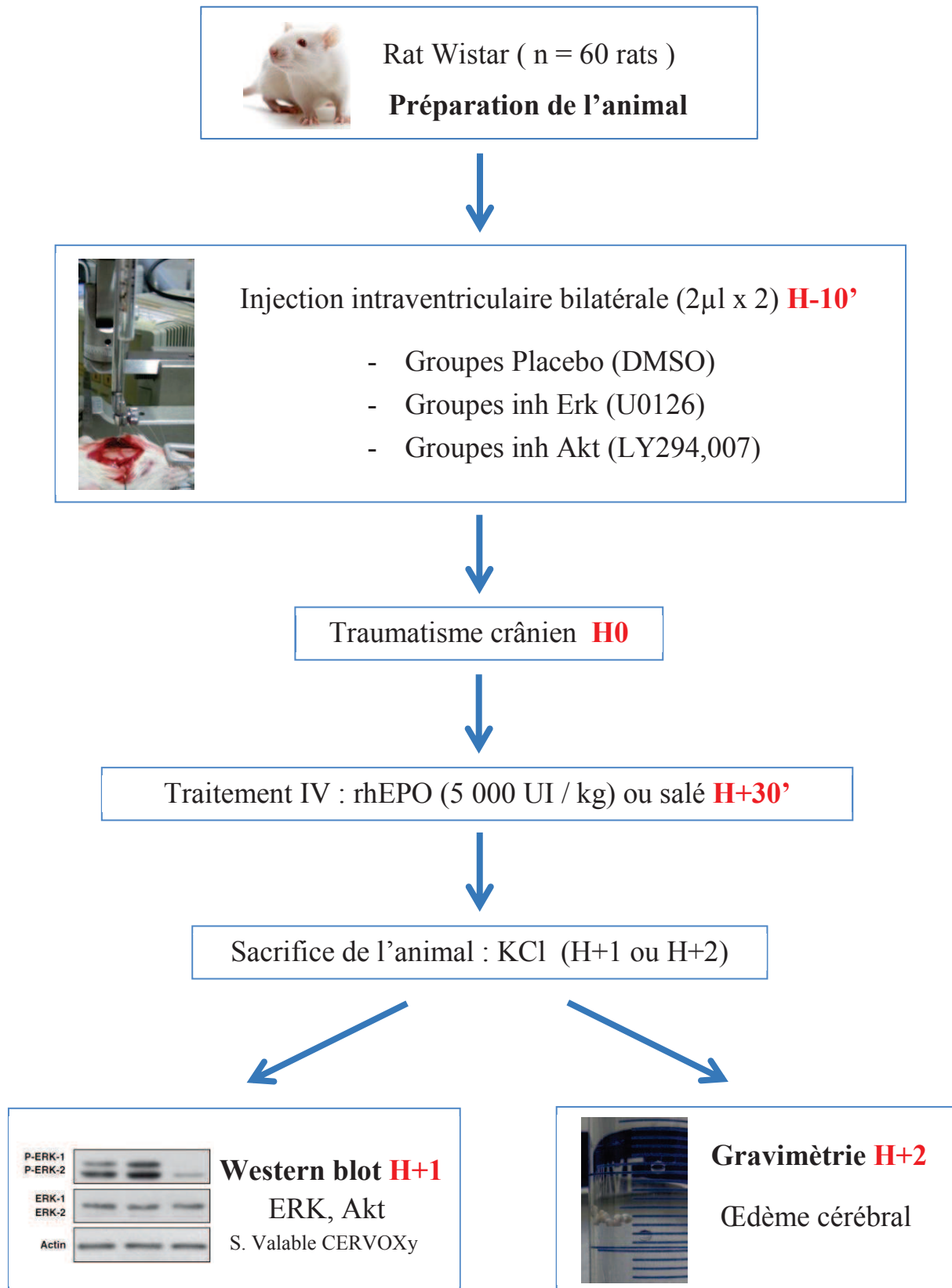
- a. Réalisation de la colonne de gravimétrie
- b. Détermination de la gravité spécifique des échantillons ○ à l'aide de l'étalonnage de solution de K_2SO_4 de différentes densités - · - · - ·

8. Analyse statistique des résultats

Les données ont été exprimées en moyenne \pm déviation standard. Les comparaisons statistiques ont été réalisées à l'aide de tests de Mann-Whitney ; données analysées avec le logiciel Statview®.

$p < 0,05$ a été considéré comme statistiquement significatif.

9. Synthèse : schéma de l'étude



Partie 3 : Résultats

1. Validation du modèle avec injection intraventriculaire

Souhaitant injecter les inhibiteurs des MAPkinases en intracérébroventriculaire, la première partie du travail a consisté en la validation d'un modèle d'injection intraventriculaire pour nos rats avec deux temps :

- Dans un premier temps, la validation des injections intracérébroventriculaires.
- Et dans un deuxième temps, la validation de ces injections intracérébroventriculaires dans notre modèle de traumatisme crânien.

1.1. Validation des injections intracérébroventriculaires

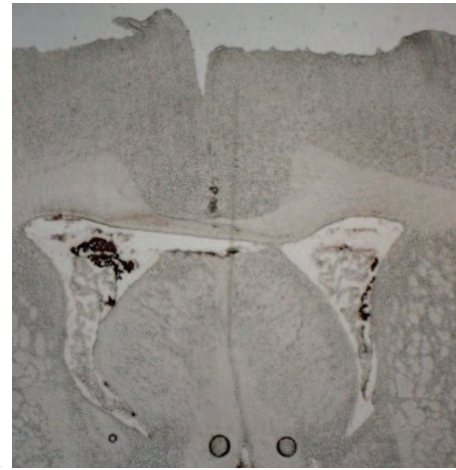
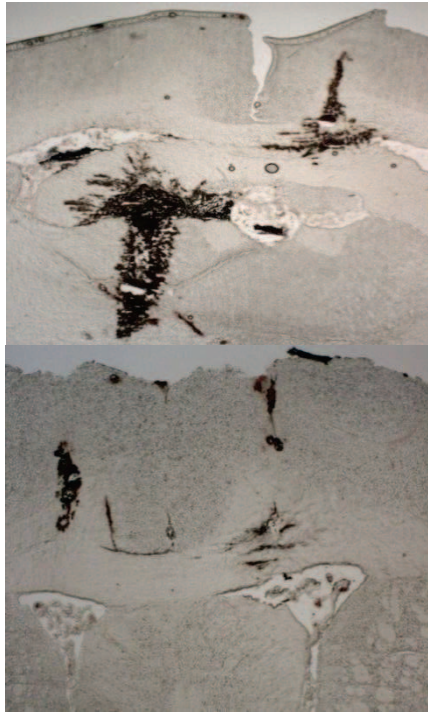
Les atlas anatomiques et les données bibliographiques d'injection intraventriculaire chez des rats mâles Wistar nous ont permis de définir des repères possibles. Ces repères ont été ensuite testés.

Le rat a été positionné dans un cadre stéréotaxique. Après l'incision du scalp, le bregma a servi de repère fixe sur la voûte crânienne. Les repères ont ensuite été pris, une aiguille de 25GA a permis de réaliser l'orifice de craniotomie et l'injection intraventriculaire bilatérale de 2 μ l d'encre de Chine (visualisable en microscopie optique (MO)) a été effectuée à l'aide d'une aiguille de Hamilton de 26 GA (*Figure 6*). Malheureusement, aucun reflux de liquide céphalorachidien n'a été possible après aspiration.

Figure 6 : rat positionné dans le cadre stéréotaxique, orifices de craniotomie visualisables en arrière du bregma, injection intraventriculaire prête à être effectuée.



L'animal a ensuite été sacrifié par une injection intraveineuse de chlorure de potassium. Son cerveau a été prélevé et immédiatement congelé. Des coupes sur les régions d'intérêt (les 2 ventricules latéraux) ont été réalisées à l'aide d'un cryotome et ensuite visualisées au microscope optique. Après plusieurs tentatives infructueuses (*figures 7a et b*), des repères ont été validés (*figure 7c*): l'injection sera bilatérale par sécurité, et à partir du bregma de 0,8 mm en antéropostérieur, 1,5 mm en latéral, en profondeur de 3,5 mm à gauche et de 4 mm à droite. Au total, 15 rats ont permis de valider ces repères. 11 rats dont 6 rats consécutifs en fin de validation ont eu une injection d'encre de Chine dans les ventricules latéraux.



Figures 7 : Coupes de cerveau visualisées en MO :

- **a, b :** échecs d'injection intraventriculaire d'encre de Chine avec des injections dans le corps calleux, pas assez ou trop profondes
- **c :** présence d'encre de Chine dans les 2 ventricules latéraux : repères valides

Enfin, pour avoir une idée du délai de diffusion après une injection intracérébroventriculaire, une injection intraventriculaire de gadolinium a été effectuée sur un rat avec acquisition de séquences IRM pondérées en T1 toutes les 5 minutes. La diffusion du gadolinium a été rapide et précoce (inférieure à 10-15 minutes) (*figure 8*) laissant supposer une rapide diffusion de nos inhibiteurs.

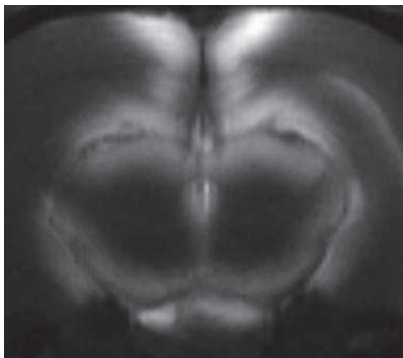


Figure 8 : diffusion du gadolinium 15 minutes après son injection intraventriculaire

1.2. Validation des injections intracérébroventriculaires dans notre modèle de traumatisme crânien

Après avoir validé les injections intraventriculaires, il a fallu nous assurer qu'elles ne perturbaient pas notre modèle de traumatisme crânien diffus. Ainsi, les données du contenu en eau intracérébral, issues de nos précédentes expérimentations, des rats soumis à notre modèle de TC diffus traités ou non par EPO sans injection intraventriculaire, ont été comparées à celles de nos rats avec injections intraventriculaires.

La comparaison a été réalisée entre 10 rats traumatisés sans injection intraventriculaire traités par EPO (TC-EPO n=5) ou non (TC-salé n=5) et 10 rats traumatisés avec injection intraventriculaire traités par EPO (TC-Placebo-EPO n=5) ou non (TC-Placebo-salé n=5).

Aucune différence significative en terme de contenu en eau intracérébral exprimé en pourcentage au niveau du cortex à H+2 n'a été mise en évidence entre les rats TC-salé (81,6% ± 1,5) et TC-Placebo-salé (81,3% ± 1,4), ni entre les rats TC-EPO (79,8% ± 0,15) et TC-Placebo-EPO (79,3% ± 1,2). (Figure 9).

La diminution significative de l'œdème cérébral post-traumatisme crânien après traitement par EPO (81,6% ± 1,5 (TC-salé) *versus* 79,8% ± 0,15 (TC-EPO)(0,049)) a été retrouvée dans notre modèle avec injection intraventriculaire (81,3% ± 1,4 (TC-Placebo-salé) *versus* 79,3% ± 1,2 (TC-Placebo-EPO)). (p < 0,05) (Figure 9).

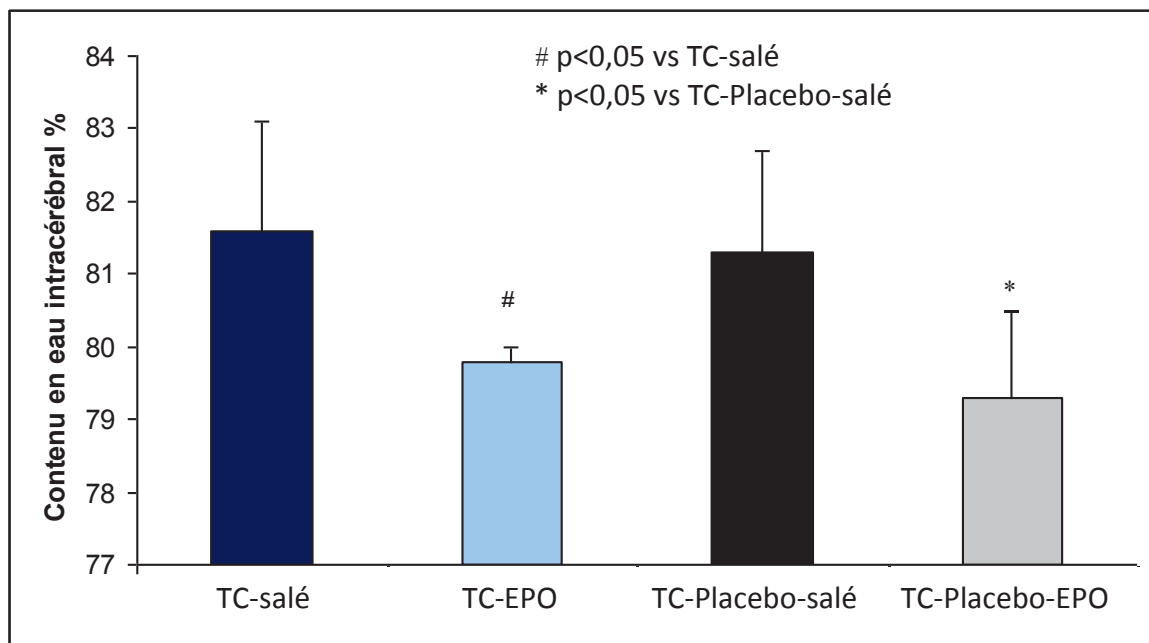


Figure 9 : Contenu en eau intracérébral à H+2 au niveau du cortex dans les groupes de TC et TC-Placebo. Données exprimées en pourcentage du contenu en eau intracérébral ± DS.

2. Vérification de l'inhibition de la phosphorylation de Erk et Akt par U0126 et LY294,002

L'analyse de la phosphorylation de Erk et Akt a été réalisée à H +1 sur 30 rats avec 5 rats par groupes : groupes TC-Placebo-salé, TC-Placebo-EPO, TC-inh Erk-salé, TC-inh Erk-EPO, TC-inh Akt-salé, TC-inh Akt-EPO.

Samuel Valable et son équipe CERVOXy de Caen ont pu confirmer par western blot que les inhibiteurs U0126 éthanolate et LY294,002 hydrochloride ont correctement inhibé respectivement Erk et Akt. De même, les injections intraventriculaires n'ont pas modifié les différences de phosphorylation retrouvées dans le modèle sans injection intraventriculaire.

3. Implication de Erk dans l'effet antiœdémateux de l'EPO

Afin de déterminer l'implication de Erk dans l'effet antiœdémateux de l'EPO, son inhibiteur U0126 a été utilisé.

Deux heures après le traumatisme crânien H+2, le contenu en eau intracérébral a été significativement diminué chez les rats TC-inh Erk-salé par rapport aux rats TC-Placebo-salé ($79.7 \% \pm 0.4$ versus $81.3 \% \pm 1.4$, $p < 0,05$). (Figure 10).

Plus intéressant, aucune différence significative n'a été retrouvée entre les rats TC-inh Erk-salé et les rats TC-inh Erk-EPO ($79.7 \% \pm 0.4$ versus $79.8 \% \pm 0.6$). (Figure 10).

Ainsi, l'inhibition de Erk semble reproduire les effets anti-œdémateux de l'EPO sans effet additif. L'effet anti-œdémateux cérébral de l'EPO après TC diffus pourrait donc être médié par l'inhibition précoce de la phosphorylation Erk.

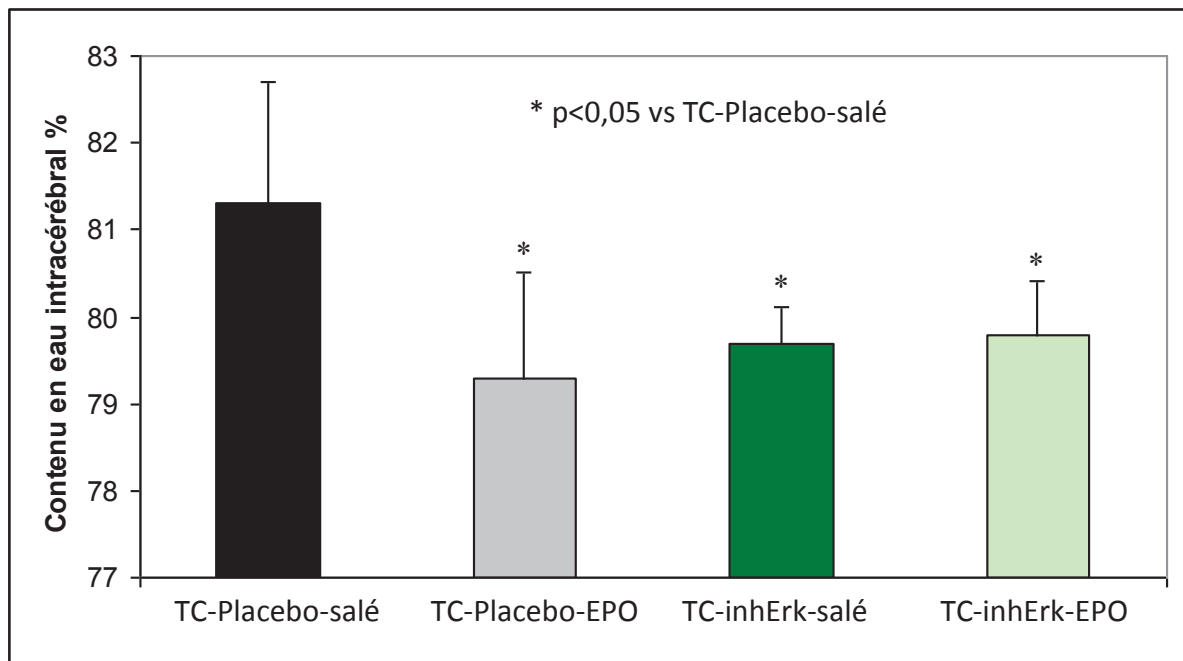


Figure 10 : Contenu en eau intracérébral à H+2 du TC au niveau du cortex dans les groupes de rats TC-Placebo et TC-inhErk. Données exprimées en pourcentage du contenu en eau intracérébral \pm DS.

4. Rôle de Akt dans l'effet antioœdémateux précoce de l'EPO

Afin d'investiguer l'implication de la voie Akt dans les effets de l'EPO, son inhibiteur LY294,007 a été utilisé. A H+2 du TC, le contenu en eau intracérébral au niveau du cortex cérébral a été étudié.

Aucune différence significative n'a été retrouvée entre les rats TC-inh Akt-salé et les rats TC-Placebo-salé ($81,1\% \pm 1$ versus $81,3\% \pm 1,4$). (Figure 11).

L'administration d'EPO a diminué significativement le contenu en eau intracérébral : respectivement $79,6\% \pm 0,9$ dans le groupe TC-inh Akt-EPO versus $81,1\% \pm 1$ dans le groupe TC-inh Akt-salé. (Figure 11).

De plus, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les animaux du groupe TC-inh Akt-EPO et ceux du groupe TC-Placebo-EPO ($79,6\% \pm 0,9$ versus $79,3\% \pm 1,2$), soit sans Akt, l'EPO agit toujours. (Figure 11).

Ces résultats suggèrent une faible ou non implication de Akt dans l'effet antioœdémateux de l'EPO.

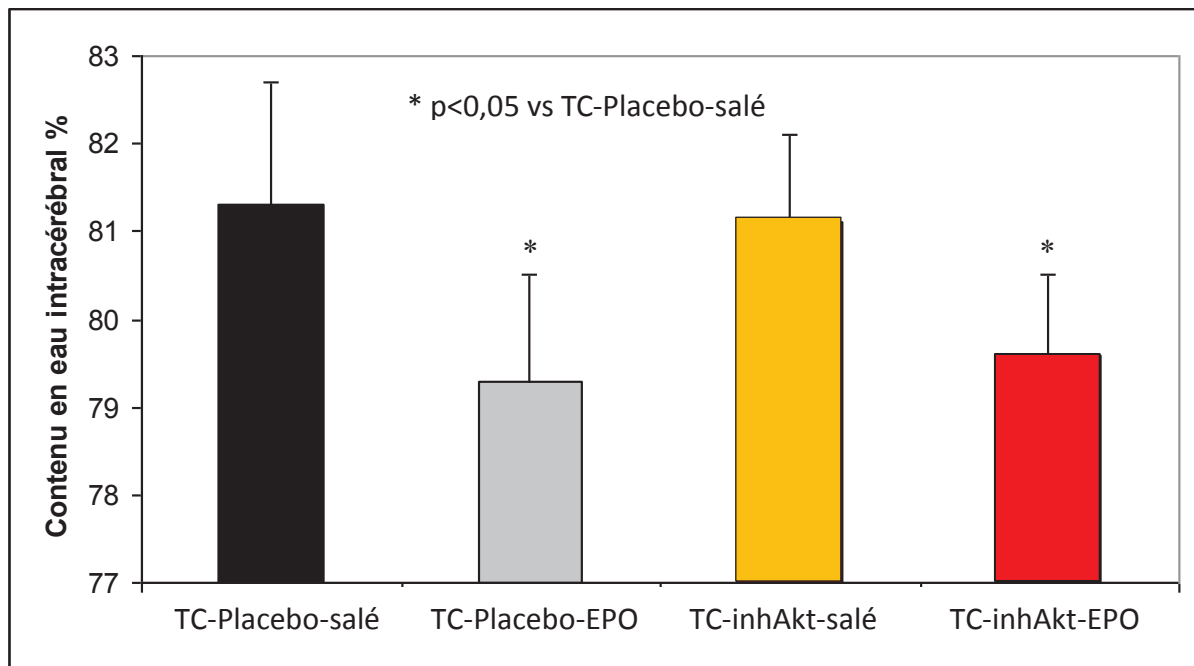


Figure 11 : Contenu en eau intracérébral à H+2 du TC au niveau du cortex dans les groupes de rats TC-Placebo et TC-inhAkt. Données exprimées en pourcentage du contenu en eau intracérébral \pm DS

Partie 4 : Conclusion - Discussion

Cette étude expérimentale montre l'implication de la voie de Erk dans l'effet antiœdémateux précoce exercé par l'EPO dans notre modèle de TC diffus chez le rat.

Pour le démontrer, nous avons validé un modèle d'injection intraventriculaire. En effet, ce modèle a été indispensable en raison de la nécessité d'une injection des inhibiteurs de Erk et d'Akt directement en intracérébral.

La première validation, concernant la technique d'injection, s'est faite par injection d'encre de Chine en intraventriculaire et visualisation de son dépôt correct dans les ventricules latéraux. Ces injections ont permis de valider des repères sur 15 rats avec un taux de succès de 100 % avec une injection bilatérale pour 11 rats dont 6 rats consécutifs en fin de validation. Les repères suivants ont été choisis pour des rats mâles Wistar de 300- 450 g : à partir du bregma de 0,8 mm en antéropostérieur, 1,5 mm en latéral, en profondeur de 3,5 mm à gauche et de 4 mm à droite

Ensuite, nous avons confirmé que les injections intraventriculaires ne perturbaient pas le modèle de TC diffus déjà étudié. Avec ou sans injection intraventriculaire, le TC entraîne un œdème cérébral comparable à H+2 du traumatisme crânien. Après traitement par EPO, la diminution de l'OC est similaire que ce soit avec ou sans injection intraventriculaire. Les propriétés anti-œdémateuses précoces de l'EPO sont ainsi retrouvées.

Nous avons ensuite pu confirmer grâce à la collaboration de l'équipe CERVOxy de Caen que l'inhibition respective de Erk par U0126 et d'Akt par LY LY294,002 était effective.

Ainsi, nous disposons d'un modèle fiable permettant une étude des modifications de phosphorylation soit d'activation des voies de Erk et de Akt, modifications très précoces H+1, et de l'œdème cérébral mesuré là aussi précocement à H+2.

Nous avons tout d'abord montré que la voie de signalisation intracellulaire Erk semble primordiale pour expliquer l'effet anti-œdémateux de l'EPO.

La protéine kinase Erk (Extra cellular signal-regulated kinase), appartenant à la famille des Mitogen-activated protein kinases, joue un rôle pivot dans un grand nombre de fonctions cellulaires de types cellulaires différents. Elle est impliquée dans les phénomènes de mort ou survie cellulaire³⁰. Erk a d'avantage été étudiée dans des modèles d'AVC où une augmentation de sa phosphorylation (ie son activation) en post-AVC est retrouvée^{31,32,25,33}. En revanche, l'implication de la voie de Erk, comme agent neuroprotecteur dans l'AVC varie selon les études : son inhibition ayant soit un effet bénéfique³¹ soit pas d'effet²⁵. Peu d'études

se sont intéressées au rôle de Erk dans le cadre du traumatisme crânien. Après TC focal, la forme phosphorylée de Erk augmente et son inhibition diminue le volume des lésions, augmente la survie neuronale^{22,23} et améliore le devenir neurologique²³. Notre étude, pour la première fois dans un modèle de traumatisme crânien diffus, a montré des résultats similaires avec l'augmentation précoce (H+1) de la phosphorylation de Erk post-TC immédiat et un effet bénéfique de son inhibition (ie anti œdémateux cérébral). Enfin, notre but a été de mettre en évidence un éventuel lien entre l'effet anti œdémateux de l'EPO et Erk. Après traitement par EPO, on a noté précocement une inhibition de la phosphorylation de Erk (H+1) et une diminution de l'OC ; l'inhibition de Erk a abouti à une diminution de l'œdème cérébral comparable à celle observée après traitement par EPO. Encore plus intéressant, aucune diminution significative supplémentaire de l'OC n'a été retrouvée après traitement par EPO et inhibition de Erk, soit pas d'effet additif mis en évidence. Ainsi, dans notre modèle de TC diffus, nous avons montré une possible relation causale entre l'inhibition de la voie Erk par l'EPO et l'effet antiœdémateux de l'EPO et ce très précocement, respectivement à H+1 et H+2. L'inhibition de Erk au niveau cérébral pourrait être ainsi une potentielle cible thérapeutique.

Nous avons ensuite noté que l'implication de Akt dans l'effet anti-œdémateux de l'EPO paraissait peu ou pas importante.

La serine threonine kinase Akt aurait elle aussi une place importante dans la survie neuronale. En effet, sa forme phosphorylée a un effet anti-apoptotique³⁴. Plusieurs études expérimentales portant sur des modèles de lésions du système nerveux central mettent en évidence des modulations de la phosphorylation de Akt : généralement, une augmentation de la phosphorylation d'Akt est notée^{32,33,35,36} sauf pour une étude de TC focal chez la souris, où est initialement observée une baisse de la phosphorylation d'Akt puis secondairement une hausse²⁴. Dans notre étude, nous n'avons retrouvé d'augmentation de la phosphorylation de Akt qu'après traitement par EPO. De plus, l'inhibition de Akt n'a pas entraînée d'aggravation de l'œdème cérébral. Cette donnée est en contradiction avec les études de Shen³⁵ et Sattler³⁶ mais celles-ci portent sur des modèles expérimentaux de lésions rétiniennes et de sclérose en plaque où l'inhibition de Akt est alors délétère. Enfin, dans notre étude, l'EPO conserve ses propriétés anti-œdémateuses alors que Akt est inhibée. La voie Akt n'apparaît pas comme primordiale dans l'action anti-œdémateuse cérébrale de l'EPO. Cependant, cette donnée ne signifie pas que la voie Akt ne joue pas un rôle important dans l'effet neuroprotecteur de l'EPO. En effet, l'effet neuroprotecteur de l'EPO ne se résume pas qu'à un seul effet anti-œdémateux : l'EPO serait « un agent neuroprotecteur multimodal »³⁷ agissant sur des types cellulaires bien différents (neurones et précurseurs, astrocytes, microglie, cellules endothéliales) avec des actions et propriétés variées : neurorégénération (neurogénèse, angiogénèse), anti-inflammatoires, anti-oxydatives, anti-apoptotiques, maintien de la BHE. Akt aurait un rôle anti-apoptotique.

En somme, nous avons pu confirmer l'action anti-œdémateuse précoce de l'EPO et mieux préciser les voies de signalisation impliquées à l'origine de celle-ci.

Avec son effet anti-œdémateux précoce, ses effets pléiotropes, son mécanisme d'action de mieux en mieux connu, l'érythropoïétine paraît séduisante pour les cliniciens que nous sommes.

L'érythropoïétine et sa forme recombinante humaine (rhEPO) présentent le considérable avantage d'être largement utilisées et donc connues, en clinique dans le cadre du traitement de l'anémie des insuffisants rénaux chroniques. Dans cette indication, l'EPO s'avère être une molécule intéressante³⁸.

Trois essais cliniques randomisés, en double aveugle se sont intéressés aux propriétés neuroprotectrices de l'EPO. Le plus important⁸, portant sur quarante patients atteints d'accident vasculaire ischémique, objective une diminution de la taille des lésions, une amélioration du devenir neurologique et fonctionnel des patients traités par EPO. Dans une étude portant sur quatre-vingt patients atteints d'hémorragie sous-arachnoïdienne anévrysmale³⁹, l'EPO permet une diminution de l'intensité du vasospasme et de ses complications ischémiques. La dernière étude⁴⁰ s'est intéressée aux effets neuroprotecteurs de l'EPO lors de traumatismes crâniens mais compte-tenu du très faible effectif (16 patients !) et des critères de jugement peu appropriés, aucune conclusion ne peut en être tirée. Dans ces trois études, aucun effet indésirable notamment de type thromboembolique n'a été rapporté.

Enfin, une grosse étude⁴¹ portant sur des patients hospitalisés en réanimation montre une diminution de la mortalité au 29^{ème} jour après traitement par EPO avec une tendance à une augmentation des événements thromboemboliques chez les patients traités par EPO et ne bénéficiant pas de prévention thromboembolique par héparine ou médicaments apparentés. Une analyse post-hoc⁴² de ces données objective un bénéfice plus important chez les patients traumatisés.

Ainsi, ces données sont en faveur d'une utilisation de l'EPO comme agent neuroprotecteur chez les patients traumatisés crâniens. Toutefois, une mise en garde récente de la FDA (Food and Drug Administration)⁴³ a porté sur les potentiels effets indésirables de l'EPO. En effet, l'EPO exerce certes un effet cytoprotecteur recherché mais a cette action érythropoïétique initialement décrite et non forcément désirée. L'action érythropoïétique pro thrombotique et pro oncogénique de l'EPO représente donc un frein à son utilisation. L'équipe allemande d'Ehrenreich a repris le même profil d'étude sur l'AVC sus-citée avec comme seule différence l'utilisation désormais possible de la thrombolyse comme ressource thérapeutique. Cette fois-ci, une surmortalité est retrouvée après traitement par rhEPO⁴⁴. La vigilance est donc de mise.

Plusieurs questions restent encore en suspens et non des moindres :

- quelle dose d'EPO utiliser pour engendrer un effet neuroprotecteur ? Il semblerait que ces doses soient supérieures à celles communément utilisées à visée érythropoïétique.
- Combien de doses ? Une dose unique ou une dose par jour pendant quelques jours comme parfois suggéré ?

- Dans quel délai administrer l'EPO ?
- Ces questions portent essentiellement sur la transposition animal/homme.
- Notre étude ne présente pas d'étude neurocomportementale. Cette dernière serait intéressante pour confirmer le parallélisme supposé entre diminution de l'OC et amélioration neurologique.
- L'utilisation de l'EPO chez nos patients traumatisés crâniens ? Chez ces patients une prophylaxie thromboembolique par héparine ou équivalent n'est pas possible immédiatement, peut-on envisager ce traitement à risque thromboembolique chez ces patients déjà à risque ?
- Une attitude pragmatique serait de tester son utilisation chez les patients traumatisés crâniens sans antécédent thromboembolique nécessitant à court ou à moyen terme une transfusion : population assez fréquente parmi nos traumatisés.

Ainsi, des analogues de l'EPO dépourvus de cette action érythropoïétique mais avec son effet cytoprotecteur sont en cours d'études⁴⁵. La CEPO (érythropoïétine carbamylée) apparaît ainsi prometteuse avec récemment la mise en évidence d'un effet antioédémateux précoce associé à une amélioration neurocomportementale⁴⁶ mais des études complémentaires sont encore nécessaires avant une transposition en clinique.

Thèse soutenue par : Mlle Marie-Cécile Fèvre

Titre :

Rôle des voies de signalisation de deux protéines kinases, Erk et Akt, dans l'effet anti-œdémateux de l'érythropoïétine

Conclusion :

Les thérapeutiques actuelles de prise en charge du traumatisme crânien (TC) sont symptomatiques et n'agissent pas sur la constitution de l'œdème cérébral. Ainsi, notre équipe s'est intéressée à l'érythropoïétine (EPO), molécule potentiellement neuroprotectrice, dans un modèle de TC diffus. Nous avons montré que l'EPO exerçait précocement un effet anti-œdémateux cérébral. L'objectif principal de cette étude expérimentale a été de mettre en évidence une éventuelle relation de causalité entre les voies de signalisation de deux protéines kinases, extra-cellular regulated kinase (Erk) et serine-threonine kinase (Akt ; voie du phosphatidyl-inositol-triphosphate) par l'EPO et la diminution de l'œdème cérébral (OC).

Deux séries d'expériences ont été réalisées sur des rats mâles Wistar pour :

- valider un modèle d'injection intracérébroventriculaire
- appliquer ce modèle pour les injections des inhibiteurs spécifiques d'Erk et Akt afin d'étudier la relation entre EPO et effet anti-œdémateux.

1). Après avoir été placé dans un cadre stéréotaxique, les rats subissaient une injection intracérébroventriculaire d'encre de Chine. Après sacrifice de l'animal, les coupes de cerveau étaient visualisées au microscope optique afin de préciser la localisation de l'encre de Chine (n=15 rats).

2). Après injection intracérébroventriculaire soit du placebo, soit de U0126, inhibiteur de Erk, ou soit de LY294,002, inhibiteur de Akt, les rats étaient soumis à un traumatisme crânien diffus (type impact-accélération). Trente minutes après le TC, ils recevaient par voie intraveineuse soit du sérum physiologique (salé) soit de l'EPO (5 000 UI/kg) (n=5 rats par groupe). Une heure après le TC (H+1), les modifications de phosphorylation intracérébrale d'Erk et Akt étaient étudiées par Western blot. Deux après le TC (H+2), l'OC était mesuré par gravimétrie. Au total 6 groupes de rats ont été étudiés : TC-placebo-salé, TC-inhErk-salé, TC-inhAkt-salé, TC-placebo-EPO, TC-inhErk-EPO, TC-inhAkt-EPO.

Les injections intracérébroventriculaires d'encre de Chine ont permis de valider des repères sur 15 rats avec un taux de succès de 100 % avec une injection bilatérale pour 11 rats dont 6 rats consécutifs en fin de validation. Nous avons ensuite pu montrer que le modèle avec injection intracérébroventriculaire ne modifiait pas notre modèle de TC diffus. En effet,

on note une augmentation de l'OC similaire chez les rats soumis à un TC sans ou avec injection intracérébroventriculaire respectivement $81,6\% \pm 1,5$ (groupe TC-salé) *versus* $81,3\% \pm 1,4$ (groupe TC-placebo-salé); de même, la diminution de l'OC après traitement par EPO est comparable entre le modèle sans injection intracérébroventriculaire ($79,8\% \pm 0,15$ (TC-EPO)) et le modèle avec injection intracérébroventriculaire ($79,3\% \pm 1,2$ (TC-placebo-EPO)).

L'étude des Western blot à H+1 post-TC a confirmé la correcte inhibition d'Erk et Akt par leur inhibiteur respectif et les données retrouvées dans une étude antérieure. En effet, une heure après le TC, on observe une augmentation de la phosphorylation d'Erk ; après traitement par EPO, cette dernière est au contraire inhibée. Akt n'est pas significativement modifié suite au TC ; en revanche, après traitement par EPO, la phosphorylation d'Akt est significativement augmentée.

A H+2, les données gravimétriques ont permis de quantifier l'œdème cérébral post-TC. Après inhibition d'Erk, la diminution de l'œdème cérébral est comparable à celle observée après traitement par EPO : $79,7\% \pm 0,4$ (TC-inh Erk-salé) *versus* $79,3\% \pm 1,2$ (TC-placebo-EPO). De plus, après inhibition d'Erk, l'effet du traitement par EPO n'est pas additif ($79,7\% \pm 0,4$ (TC-inh Erk-salé) *versus* $79,8\% \pm 0,6$ (TC-inh Erk-EPO)). La modulation d'activation de la voie Erk apparait donc primordiale pour expliquer les effets anti-œdémateux de l'EPO. La voie Akt apparait elle peu ou pas impliquée dans cette action anti-œdémateuse. En effet, après inhibition de Akt, il n'est noté ni diminution ni aggravation de l'OC ($81,1\% \pm 1$ (TC-inh Akt-salé) *versus* $81,3\% \pm 1,4$ (TC-placebo-salé)) et le traitement par EPO est toujours aussi efficace ($81,1\% \pm 1$ (TC-inh Akt-salé) *versus* $79,6\% \pm 0,9$ (TC-inh Akt-EPO)).

En somme, cette étude expérimentale a permis de confirmer que l'administration précoce post-traumatique d'EPO permet la réduction de l'œdème cérébral post-TC et de montrer le rôle important joué par l'inhibition de la voie Erk par l'EPO dans cet effet anti-œdémateux. L'EPO pourrait être ainsi un potentiel traitement de l'OC post traumatisme crânien diffus et l'inhibition de Erk une possible cible thérapeutique.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 15/9/2011


LE DOYEN

M. le Professeur J.P. Romanet




LE PRESIDENT DU JURY

M. le Professeur J-F. Payen

le 5/09/11

Professeur Jean-François PAYEN
Pôle Anesthésie Réanimation
CHU GRENOBLE

Bibliographie

1. McArthur DL, Chute DJ, Villablanca JP. Moderate and severe traumatic brain injury: epidemiologic, imaging and neuropathologic perspectives. *Brain Pathol* 2004;14(2):185-94.
2. Masson F, Thicoipe M, Mokni T, Aye P, Erny P, Dabadie P. Epidemiology of traumatic comas: a prospective population-based study. *Brain Inj* 2003;17(4):279-93.
3. Payen JF, Fauvage B., Lavagne P, Falcon D. Traitement de l'oedème cérébral. Conférence d'actualisation Sfar 2001 2001;Les essentiels, ed. E. SAS.
4. Hasselblatt M, Ehrenreich H, Sirén AL. The brain erythropoietin system and its potential for therapeutic exploitation in brain disease. *J Neurosurg Anesthesiol.* 2006 Apr;18(2):132-8.
5. Brines M, Cerami A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2005 Jun;6(6):484-94.
6. Genc S, Koroglu TF, Genc K. Erythropoietin and the nervous system. *Brain Res.* 2004 Mar 12;1000(1-2):19-31
7. Ghezzi P, Brines M. Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death Differ.* 2004 Jul;11 Suppl 1:S37-44
8. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 2002;8(8):495-505.
9. Cherian L, Goodman JC, Robertson C. Neuroprotection with erythropoietin administration following controlled cortical impact injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007 Aug;322(2):789-94.
10. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 ; 97(19):10526-31
11. Grasso G, Sfacteria A, Meli F, Fodale V, Buemi M, Iacopino DG. Neuroprotection by erythropoietin administration after experimental traumatic brain injury. *Brain Res.* 2007 Nov 28;1182:99-105.
12. Ning R, Xiong Y, Mahmood A, Zhang Y, Meng Y, Qu C, Chopp M. Erythropoietin promotes neurovascular remodeling and long-term functional recovery in rats following traumatic brain injury. *Brain Res.* 2011 Apr 12;1384:140-50.
13. Xiong Y, Lu D, Qu C, Goussev A, Schallert T, Mahmood A, Chopp M. Effects of erythropoietin on reducing brain damage and improving functional outcome after traumatic brain injury in mice. *J Neurosurg.* 2008 Sep;109(3):510-21.
14. Hartley CE, Varma M, Fischer JP, Riccardi R, Strauss JA, Shah S, Zhang S, Yang ZJ. Neuroprotective effects of erythropoietin on acute metabolic and pathological changes in experimentally induced neurotrauma. *J Neurosurg.* 2008 Oct;109(4):708-14.

15. Chen G, Shi JX, Hang CH, Xie W, Liu J, Liu X. Inhibitory effect on cerebral inflammatory agents that accompany traumatic brain injury in a rat model: a potential neuroprotective mechanism of recombinant human erythropoietin (rhEPO). *Neurosci Lett*. 2007 Oct 2;425(3):177-82.
16. 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(12):1701-3.
17. Zhang Y, Xiong Y, Mahmood A, Meng Y, Qu C, Schallert T, Chopp M. Therapeutic effects of erythropoietin on histological and functional outcomes following traumatic brain injury in rats are independent of hematocrit. *Brain Res*. 2009 Oct 19;1294:153-64.
18. Mahmood A, Lu D, Qu C, Goussev A, Zhang ZG, Lu C, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in rats with erythropoietin and carbamylated erythropoietin. *J Neurosurg*. 2007 Aug;107(2):392-7.
19. Verdonck O, Lahrech H, Francony G, Carle O, Farion R, Van de Looij Y, Remy C, Segebarth C, Payen JF. Erythropoietin protects from post-traumatic edema in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007 Jul;27(7):1369-76.
20. Noguchi CT, Asavaritikrai P, Teng R, Jia Y. Role of erythropoietin in the brain. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007 Nov;64(2):159-71.
21. Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature*. 2001 Aug 9;412(6847):641-7.
22. Mori T, Wang X, Jung JC, Sumii T, Singhal AB, Fini ME, Dixon CE, Alessandrini A, Lo EH. Mitogen-activated protein kinase inhibition in traumatic brain injury: in vitro and in vivo effects. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002 Apr;22(4):444-52.
23. Otani N, Nawashiro H, Fukui S, Ooigawa H, Ohsumi A, Toyooka T, Shima K. Role of the activated extracellular signal-regulated kinase pathway on histological and behavioral outcome after traumatic brain injury in rats. *J Clin Neurosci*. 2007 Jan;14(1):42-8.
24. Noshita N, Lewén A, Sugawara T, Chan PH. Akt phosphorylation and neuronal survival after traumatic brain injury in mice. *Neurobiol Dis*. 2002 Apr;9(3):294-304.
25. Kilic E, Kilic U, Soliz J, Bassetti CL, Gassmann M, Hermann DM. Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK-1/-2 and Akt pathways. *FASEB J* 2005;19(14):2026-8.
26. Valable S, Francony G, Bouzat P, Fevre MC, Mahious N, Bouet V, Farion R, Barbier E, Lahrech H, Remy C, Petit E, Segebarth C, Bernaudin M, Payen JF. The impact of erythropoietin on short-term changes in phosphorylation of brain protein kinases in a rat model of traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010 Feb;30(2):361-9.
27. Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg*. 1994 Feb;80(2):291-300.
28. Foda MA, Marmarou A. A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg*. 1994 Feb;80(2):301-13.
29. Fatouros PP, Marmarou A. Use of magnetic resonance imaging for in vivo measurements of water content in human brain: method and normal values. *J Neurosurg* 1999;90(1):109-15.

30. Subramaniam S, Unsicker K. Extracellular signal-regulated kinase as an inducer of non-apoptotic neuronal death. *Neuroscience*. 2006;138(4):1055-65.
31. Namura S, Iihara K, Takami S, Nagata I, Kikuchi H, Matsushita K, Moskowitz MA, Bonventre JV, Alessandrini A. Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 25;98(20):11569-74.
32. Sirén AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Mar 27;98(7):4044-9.
33. Lee SM, Nguyen TH, Park MH, Kim KS, Cho KJ, Moon DC, Kim HY, Yoon DY, Hong JT. EPO receptor-mediated ERK kinase and NF-kappaB activation in erythropoietin-promoted differentiation of astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Aug 6;320(4):1087-95.
34. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 1998 Nov 13;282(5392):1318-21.
35. Shen J, Wu Y, Xu JY, Zhang J, Sinclair SH, Yanoff M, Xu G, Li W, Xu GT. ERK- and Akt-dependent neuroprotection by erythropoietin (EPO) against glyoxal-AGEs via modulation of Bcl-xL, Bax, and BAD. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 Jan;51(1):35-46.
36. Sättler MB, Merkler D, Maier K, Stadelmann C, Ehrenreich H, Bähr M, Diem R. Neuroprotective effects and intracellular signaling pathways of erythropoietin in a rat model of multiple sclerosis. *Cell Death Differ*. 2004 Dec;11 Suppl 2:S181-92.
37. Byts N, Sirén AL. Erythropoietin: a multimodal neuroprotective agent. *Exp Transl Stroke Med*. 2009 Oct 21;1:4.
38. Nurko S. Anemia in chronic kidney disease: causes, diagnosis, treatment. *Cleve Clin J Med*. 2006 Mar;73(3):289-97.
39. Tseng MY, Hutchinson PJ, Richards HK, Czosnyka M, Pickard JD, Erber WN, Brown S, Kirkpatrick PJ. Acute systemic erythropoietin therapy to reduce delayed ischemic deficits following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a Phase II randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical article*. *J Neurosurg*. 2009 Jul;111(1):171-80.
40. Nirula R, Diaz-Arrastia R, Brasel K, Weigelt JA, Waxman K. Safety and efficacy of erythropoietin in traumatic brain injury patients: a pilot randomized trial. *Crit Care Res Pract*. 2010;2010. pii: 209848.
41. Corwin HL, Gettinger A, Fabian TC, May A, Pearl RG, Heard S, An R, Bowers PJ, Burton P, Klausner MA, Corwin MJ; EPO Critical Care Trials Group. Efficacy and safety of epoetin alfa in critically ill patients. *N Engl J Med*. 2007 Sep 6;357(10):965-76.
42. Napolitano LM, Fabian TC, Kelly KM, Bailey JA, Block EF, Langholff W, Enny C, Corwin HL. Improved survival of critically ill trauma patients treated with recombinant human erythropoietin. *J Trauma*. 2008 Aug;65(2):285-97; discussion 297-9.
43. Steinbrook R. Erythropoietin, the FDA, and oncology. *N Engl J Med*. 2007 Jun 14;356(24):2448-51.

44. Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H, Schneider D, Weimar C, Wartenberg K, Schellinger PD, Bohn M, Becker H, Wegrzyn M, Jähnig P, Herrmann M, Knauth M, Bähr M, Heide W, Wagner A, Schwab S, Reichmann H, Schwendemann G, Dengler R, Kastrup A, Bartels C; EPO Stroke Trial Group. Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke*. 2009 Dec;40(12):e647-56.
45. Leist M, Ghezzi P, Grasso G, et al. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* 2004;305(5681):239-42.
46. Bouzat P, Francony G, Thomas S, Valable S, Mauconduit F, Fevre MC, Barbier EL, Bernaudin M, Lahrech H, Payen JF. Reduced brain edema and functional deficits after treatment of diffuse traumatic brain injury by carbamylated erythropoietin derivative. *Crit Care Med*. 2011 Sep;39(9):2099-105.

The impact of erythropoietin on short-term changes in phosphorylation of brain protein kinases in a rat model of traumatic brain injury

Samuel Valable^{1,2,3,6}, Gilles Francony^{1,2,4}, Pierre Bouzat^{1,2,4}, Marie-Cécile Fevre^{1,2,4}, Nouara Mahious^{1,2}, Valentine Bouet⁵, Régine Farion^{1,2}, Emmanuel Barbier^{1,2}, Hana Lahrech^{1,2}, Chantal Remy^{1,2}, Edwige Petit³, Christoph Segebarth^{1,2}, Myriam Bernaudin³ and Jean-François Payen^{1,2,4}

¹INSERM, U836, Grenoble, Cedex, France; ²Grenoble Institut des Neurosciences, Université Joseph Fourier, Grenoble, Cedex, France; ³Equipe CERVOxy, CI-NAPS, UMR 6232, Université de Caen Basse-Normandie, Université Paris-Descartes, CNRS, CEA, Caen, France; ⁴Département d'Anesthésie-Réanimation, Hôpital Michallon, Grenoble, Cedex, France; ⁵Groupe Mémoire et Plasticité comportementale (GMPc), UFR des Sciences Pharmaceutiques—Université de Caen Basse-Normandie, Caen, France

We found that recombinant human erythropoietin (rhEPO) reduced significantly the development of brain edema in a rat model of diffuse traumatic brain injury (TBI) (impact-acceleration model). In this study, we investigated the molecular and intracellular changes potentially involved in these immediate effects. Brain tissue nitric oxide (NO) synthesis, phosphorylation level of two protein kinases (extracellular-regulated kinase (ERK)-1/2 and Akt), and brain water content were measured 1 (H1) and 2 h (H2) after insult. Posttraumatic administration of rhEPO (5,000 IU/kg body weight, intravenously, 30 mins after injury) reduced TBI-induced upregulation of ERK phosphorylation, although it increased Akt phosphorylation at H1. These early molecular changes were associated with a reduction in brain NO synthesis at H1 and with an attenuation of brain edema at H2. Intraventricular administration of the ERK-1/2 inhibitor, U0126, or the Akt inhibitor, LY294002, before injury showed that ERK was required for brain edema formation, and that rhEPO-induced reduction of edema could involve the ERK pathway. These results were obtained in the absence of any evidence of blood–brain barrier damage on contrast-enhanced magnetic resonance images. The findings of our study indicate that the anti edematous effect of rhEPO could be mediated through an early inhibition of ERK phosphorylation after diffuse TBI.

Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism (2010) **30**, 361–369; doi:10.1038/jcbfm.2009.222; published online 7 October 2009

Keywords: brain trauma; cerebral edema; EPO (erythropoietin); inhibitors; MAPK (mitogen-activated protein kinase); MAPK activation after brain trauma

Correspondence: Dr Jean-François Payen, Grenoble Institut des Neurosciences, INSERM U836/Equipe 5. Université Joseph Fourier, Site Santé La Tronche. BP 170. Grenoble Cedex 9.38042 France.

E-mail: jfpayen@ujf-grenoble.fr

⁶Current address: Equipe CERVOxy, CI-NAPS, UMR 6232, Université de Caen Basse-Normandie, Université Paris-Descartes, CNRS, CEA, Caen, France.

This study was supported in part by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Institut pour la Recherche sur la Moelle Epinière et l'Encéphale (IRME), Association Française contre les Myopathies (AFM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Ligue contre le Cancer, and Ministère de l'Éducation, de la Recherche et de la Technologie, France. Epoetin alfa (Eprex) was kindly provided by Janssen-Cilag Division Ortho Biotech, Issy-les-Moulineaux, France. Study support was received from INSERM U836 and Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

Received 6 February 2009; revised 14 September 2009; accepted 22 September 2009; published online 7 October 2009

Introduction

Erythropoietin has triggered considerable interest because of several studies having indicated that it may confer neuroprotection and reduce neuronal death in *in vivo* and *in vitro* models of central nervous system injuries (Bernaudin *et al*, 1999; Brines *et al*, 2000; Cherian *et al*, 2007; Li *et al*, 2007a; Pacary *et al*, 2006; Sakanaka *et al*, 1998). In animal models of ischemia and of traumatic brain injury (TBI), erythropoietin has been found to very significantly affect neurogenesis, angiogenesis, and neuroinflammatory response (Lu *et al*, 2005; Siren *et al*, 2001; Yatsiv *et al*, 2005). In a rat model of diffuse TBI, magnetic resonance imaging (MRI) has shown that postinjury administration of recombinant human erythropoietin (rhEPO) reduces significantly the early development of diffuse brain edema and

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

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

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

Design: Adult male Wistar rats.

Setting: Neurosciences and physiology laboratories.

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

Measurements and Main Results: Three series of experiments were conducted to investigate: 1) the effect of carbamylated erythropoietin on brain edema before and 1 hr after traumatic brain injury using diffusion-weighted magnetic resonance imaging and measurements of apparent diffusion coefficient (n = 10 rats per group), and the phosphorylation level of brain extracellular-regulated kinase-1/-2 was also determined to indicate the presence of an activated cell signaling pathway; 2) the time course of brain edema using magnetic resonance imaging between 4 and 6 hrs postinjury and the gravimetric technique at 6 hrs (n = 10 rats per group); and 3) motor and cognitive function over 10 days post traumatic brain injury, testing acute somato-motor reflexes, adhesive paper removal, and two-way active

avoidance (n = 8 rats per group). Compared to traumatic brain injury-saline rats, rats receiving traumatic brain injury-carbamylated erythropoietin showed a significant reduction in brain edema formation at 1 hr that was sustained until 6 hrs when results were comparable with sham-operated rats. This anti-edematous effect of carbamylated erythropoietin was possibly mediated through an early inhibition of extracellular-regulated kinase-1/-2 phosphorylation. Compared to traumatic brain injury-saline rats, traumatic brain injury-carbamylated erythropoietin rats showed improved functional recovery of the acute somato-motor reflexes post traumatic brain injury, took less time to remove adhesive from the forelimbs, and showed higher percentages of correct avoidance responses.

Conclusion: Our findings indicate that early posttraumatic administration of carbamylated erythropoietin reduces brain edema development until at least 6 hrs postinjury and improves neurologic recovery. Carbamylated erythropoietin can thus be considered as a potential agent in the treatment of traumatic brain injury-induced diffuse edema. (Crit Care Med 2011; 39:2099–2105)

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

A large body of evidence has shown that recombinant human erythropoietin (rhEPO) possesses neuroprotective properties in several *in vitro* and *in vivo* models of central nervous system injuries

(1–3). However, these neuroprotective benefits were obtained using large and/or multiple doses of rhEPO, triggering unwanted overstimulation of the bone marrow and inducing a prothrombotic state, as shown in stroke patients (4). To ad-

dress this issue, various strategies have been developed to dissociate tissue-protective and erythropoietic activities using non-erythropoietic EPO derivatives (5).

In a model of focal brain ischemia, carbamylated EPO (CEPO) initially

*See also p. 2191.

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

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and

are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.ccmjournal.com).

Drs. Bouzat and Francony contributed equally to this work.

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

The authors have not disclosed any potential conflicts of interest.

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

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

DOI: 10.1097/CCM.0b013e31821cb7b2



SERMENT D'HIPPOCRATE

Qui diis memorem laudes, repetamque fideles
 Ingenij dotes, Hippocratisque decus.
 Democriti auditor Phœbea, ô, Coë propago,
 Certius an quis te tradidit artis opes?

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'HIPPOCRATE,

je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.