

Université de Montréal

**Les effets du fentanyl sur la douleur et la motricité suite à
une hémorragie intracérébrale induite chez le rat**

par LAURENCE SAINÉ

Département de biomédecine vétérinaire
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc)
en sciences vétérinaire option biomédecine

Décembre 2016

© Laurence Sainé, 2016

RÉSUMÉ

La douleur éprouvée lors de trauma crânien est reliée à la sensibilisation du système nerveux central et aux maux de tête chroniques lorsque la douleur n'est pas traitée. Par contre, chez l'humain, l'utilisation d'analgésiques doit être faite avec précaution puisqu'ils sont associés à des déficits moteurs et cognitifs. La présente étude vise à évaluer l'efficacité du fentanyl pour le traitement de la douleur lors d'une hémorragie intracérébrale et les effets sur la motricité en utilisant un modèle induit d'hémorragie intracérébrale chez le rat.

Pour ce faire, une hémorragie intracérébrale a été induite par injection stéréotaxique de 2 μ L de collagénase (0.5 UI), injectée dans un noyau caudoputamen, chez vingt-et-un rats Sprague-Dawley mâles sous anesthésie générale. Le groupe contrôle (n=6) a reçu de la saline sous-cutanée (SC), et les groupe expérimentaux ont reçu respectivement des doses de 5 (n=6), 10 (n=6) et 20 (n=3) μ g/kg de fentanyl SC, 2h suite à la chirurgie et ensuite 1 fois par jour pour les 2 jours suivants. Les animaux ont été évalués pendant les 5 jours suivants la chirurgie à l'aide d'une vidéo (grimace de la douleur), d'un examen neurologique, du test de la poutre et du rotarod. Le dernier jour, les animaux ont été euthanasiés, les cerveaux ont été prélevés et évalués pour déterminer le volume de l'hémorragie, l'astrocytose et le nombre de cellules nécrotiques.

Comparé aux contrôles, le groupe ayant reçu 5 μ g/kg de fentanyl a éprouvé un soulagement significatif de la douleur au jour 2 ($p < 0,01$) tandis que le groupe 10 μ g/kg a éprouvé un soulagement de façon significative au jour 1 ($p < 0,01$), 2 ($p < 0,001$) et 3 ($p < 0,01$). Pour le rotarod, le groupe 10 μ g/kg a démontré une diminution significative de sa performance aux jours 5 ($p < 0,05$) et 6 ($p < 0,02$). À l'examen neurologique, le sautillerment a montré une

piètre récupération pour les groupes de 5 et 10 µg/kg comparés au contrôle ($p < 0,01$). À l'examen des cerveaux, aucune différence n'a été observée pour les 3 paramètres entre les groupes expérimentaux.

En conclusion, le fentanyl à une dose de 10 µg/kg SC est efficace pour diminuer la douleur suite à une hémorragie intracérébrale; par contre il peut avoir un effet sur la motricité des animaux.

Mots-clés : analgésie, trauma crânien, céphalalgie, échelle de grimace, histopathologie, examen neurologique

ABSTRACT

The pain associated with traumatic brain injury is linked with the central nervous system sensitization and chronic cephalalgia when pain is not treated. However, analgesics in human patient must be done with caution since they are associated with cognitive and motor deficits. The present study aims to assess the efficiency of fentanyl to treat pain and evaluate motor behaviors on a rat model of intracerebral hemorrhage (IH).

Twenty-one male Sprague-Dawley rats underwent a stereotaxic surgery to produce a collagenase-induced IH with an injection of 2 μ L of collagenase (0.5 UI) in the right caudoputamen nucleus. The control group (n=6) received saline subcutaneously (SC), and experimental groups received either 5 (n=6), 10 (n=6), or 20 (n=3) μ g/kg of fentanyl SC, 2h following surgery and on the 2 subsequent days. The rat grimace scale, a neurological examination, balance beam test and rotarod test were performed for 5 consecutive days postoperatively to evaluate pain and motor performance. At the end of the experimentation, the animals were euthanized, the brains were collected and evaluated to determine hematoma volume, the number of reactive astrocytes and necrotic neurons.

When compared to controls, the grimace scale has showed that 5 μ g/kg fentanyl significantly alleviated pain on day 2 only ($p<0.01$) and that 10 μ g/kg alleviated pain on days 1 ($p<0.01$), 2 ($p<0.001$), and 3 ($p<0.01$). For the rotarod test, only the 10 μ g/kg group showed significant decreases in performance on days 5 ($p<0.05$) and 6 ($p<0.02$). The neurologic exam was not significantly different between groups, but only the hopping test showed a poor recuperation for the 5 and 10 μ g/kg fentanyl group when compared to saline ($p<0.01$). During brains exams, no differences were found between groups for the results of the 3 parameters.

Fentanyl, at a dose of 10 µg/kg SC, has provided a substantial analgesia following a collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats; however it can alter motor performance following analgesic treatments.

Key words: analgesia, brain trauma, cephalalgia, grimace scale, histopathology, neurological exam

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures	ix
Liste des sigles & des abréviations.....	xi
Remerciements	xv
RECENSION DE LITTÉRATURE.....	1
A. INTRODUCTION	1
B. HÉMORRAGIE CÉRÉBRALE LORS DE TRAUMA CRÂNIEN	3
1. Dommages primaires	5
2. Dommages secondaires.....	5
3. Pression intracrânienne.....	7
4. Neuroinflammation.....	9
C. DIFFÉRENTS MODÈLES ANIMAUX.....	14
1. Injection de sang entier	16
2. Impact cortical contrôlé	17
3. Injection de collagénase	18
D. TESTS COMPORTEMENTAUX.....	23
1. Tests semi-quantitatifs	24
2. Rotarod.....	25
3. Test de la poutre.....	27

E. DOULEUR	28
1. Douleur du trauma crânien	28
a) <i>Migraines chroniques</i>	29
2. Mécanismes de sensibilisation.....	32
a) <i>Neurones trijumeau-vasculaires de premier ordre</i>	32
b) <i>Neurones trijumeau-vasculaires de deuxième ordre</i>	34
c) <i>Facteur temps</i>	35
3. Évaluation de la douleur	35
a) <i>Cris à haute fréquence</i>	36
b) <i>Codification de l'expression faciale chez les rongeurs</i>	37
F. TRAITEMENT	39
1. Oxygénation.....	40
2. Diminuer la pression intracrânienne	40
3. Contrôle de la glycémie	41
4. Hypothermie	42
5. Analgésie.....	42
a) <i>Opioïdes</i>	43
b) <i>Mécanismes des opioïdes</i>	44
c) <i>Buprénorphine</i>	45
d) <i>Fentanyl</i>	45
HYPOTHÈSE ET OBJECTIF DE RECHERCHE	47
ARTICLE	
Effects of fentanyl on pain and motor behaviors following a collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats.....	48
ABSTRACT	49

Introduction	50
Materials & methods	52
Animals.....	52
Surgical procedures and collagenase injection.....	52
Treatments.....	53
Behavioral evaluations.....	54
<i>RGS & Pain Evaluation</i>	54
<i>Neurologic Exam</i>	55
<i>Balance Beam Test</i>	57
<i>Rotarod Treadmill</i>	57
Perfusion, Histological Procedures, Immunohistochemistry & Image Analysis.....	58
Statistical Analysis.....	59
Results	59
Grimace pain score.....	59
Neurological exam and individual tests.....	60
Balance beam test.....	61
Rotarod treadmill test.....	61
Histopathological results.....	62
Body weights.....	62
Discussion	63
Limitations	66
Conclusions	66
Acknowledgments.....	67
Abbreviations.....	67
Disclosure.....	67

References	67
Figures	72
DISCUSSION GÉNÉRALE	77
1. Évaluation de la douleur	78
2. Neurotoxicité	80
3. Évaluation de la motricité	81
4. Évaluation des déficits neurologiques	82
5. Le test de la poutre	83
6. Histopathologie.....	84
7. Explication possible des déficits moteurs chez le groupe de fentanyl 10 µg/kg.....	84
8. Poids corporel.....	86
9. Genre & âges des animaux	87
10. Environnement	88
11. Limitations de l'étude & études complémentaires possibles.....	89
12. Vérification de l'hypothèse	91
CONCLUSION.....	93
BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE	95

LISTE DES FIGURES

REVUE DE LITTÉRATURE

Figure 1.	Hémorragie dans un cerveau humain située dans les noyaux gris de la base.	4
Figure 2.	Mécanismes de la neuroinflammation.....	13
Figure 3.	Noyaux gris de la base (caudoputamen) dans le cerveau du rat.....	19
Figure 4.	Appareil stéréotaxique.....	20
Figure 5.	Rat dans un appareil stéréotaxique.....	20
Figure 6.	Examen neurologique.....	25
Figure 7.	Le rotarod.	26
Figure 8.	Test de la poutre.	27
Figure 9.	Quatre phases de la migraine.	33
Figure 10.	Sensibilisation centrale et périphérique.....	34
Figure 11.	Échelle de grimace du rat.....	38

ARTICLE

Figure 1.	Study protocol timeline.	72
Figure 2.	Grimace pain scores for saline and fentanyl treatment groups.	73

Figure 3. Neurological exam scores.74

Figure 4. Results for individual neurological tests.75

Figure 5. Rotarod treadmill test.76

LISTE DES SIGLES & DES ABRÉVIATIONS

ad libitum : À volonté

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

ANOVA : *Analysis of variance* (Analyse de variance)

ATP : Adénosine triphosphate

CGRP : *Calcitonin gene-related peptide* (Peptide relié au gène calcitonine)

CI : *Confidence interval* (Intervale de confiance)

CMH-II : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

CO₂ : Dioxyde de carbone

CXCL2 : Chimiochine (motif C-X-C) ligand 2

δ : Delta

ε : Epsilon

GABA : *Gamma-aminobutyric acid* (Acide γ-aminobutyrique)

GFAP : *Glial fibrillary acidic protein* (Protéine acide fibrillaire gliale)

HMGB1 : *high mobility group box 1* (protéine du groupe à haute mobilité, boîte 1)

HSP : *Heat shock proteins* (Protéines de choc thermique)

ICAM & VCAM : Super famille des immunoglobulines

ICHD-II : *International Classification of Headache Disorders, 2nd edition* (Classification internationale des désordres reliés aux maux de tête, 2^e édition)

IFN-γ : Interféron-γ

IH : *Intracerebral hemorrhage* (Hémorragie intracérébrale)

IL : Interleukine

iNOS : *Inducible nitric oxide synthase* (Oxyde nitrique synthase inductible)

IM : Intramusculaire

IV : Intraveineux

κ : Kappa

MAP-K : *Mitogen-activated protein kinase* (protéine kinase activée par des agents mitogènes)

MMP : *Matrix metalloproteinases* (Métalloprotéases matricielles)

μ : Mu

NaCl : Chlorure de sodium
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NDMA : *N-methyl-D-aspartate* (Acide *N*-méthyl-D-aspartique)
NF- κ B : *Nuclear factor- κ B* (facteur nucléaire- κ B)
NO : Oxyde nitreux
PAR-1 : *Proteinase activated receptor-1* (recepteur-1 activé par la protéase)
PT : *Prothrombin Time* (temps de prothrombine)
PTT : *Partial Thromboplastin Time* (temps de thromboplastine partielle)
PVC : *Polyvinyl chloride* (Poly(chlorure de vinyle))
RAGE : *Receptor for advanced glycation end products* (récepteur spécifique des produits finaux de glycosylation avancée)
RGS : *Rat grimace scale* (Échelle de grimace des rats)
Récepteurs H1 et H2 : Récepteurs histaminiques 1 et 2
ROS : *Reactive oxygen species* (dérivés réactifs de l'oxygène)
SC : Sous-cutané
Sham : groupe témoin
SNC : Système nerveux central
TLR : *Toll-like receptor* (récepteur type Toll)
TNF- α : *Tumor necrosis factor- α* (facteur de nécrose tumorale α)
Treg : Lymphocytes T régulateurs
TT : *Thrombin Time* (temps de thrombine)
* : valeur de p statistiquement significative

Unités :

μ g : microgramme
 μ g/mL : microgramme par millilitre
 μ g/kg : microgramme par kilogramme
 μ g/kg/h : microgramme par kilogramme par heure
 μ L : microlitre
 μ m : micromètre
g : gramme
h : heure
J : jour

kHz : kilohertz
mm : millimètre
mL : millilitre
mg/kg : milligramme par kilogramme
mg/mL : milligramme par millilitre
min : minute
n : nombre de sujets dans un groupe
ng : nanogramme
ng/mL : nanogramme par millilitre
nm : nanomètre
pH : mesure de l'acidité d'une solution
rpm : rotation par minute
sec: seconde
UI : Unité Internationale
° : degré
°C : degré Celcius
10X : grossissement microscopique fois 10
20X : grossissement microscopique fois 20

Aux rats qui donnent leur vie tous les jours pour améliorer la nôtre.



À Kiko qui me fait apprécier la médecine vétérinaire tous les jours et pour toujours!

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je voudrais remercier Dr Pascal Vachon pour m'avoir offert cette opportunité d'en apprendre davantage sur la neurologie et la recherche scientifique. Je le remercie aussi d'avoir été patient et d'avoir fait les démarches nécessaires pour que ce projet se réalise enfin. Merci pour toutes ces histoires qui piquent ma curiosité et me motivent à en savoir plus.

Je voudrais aussi remercier Dr Pierre Hélié qui a bien voulu participer à mon projet comme codirecteur de maîtrise et cela durant son année sabbatique. Merci pour vos conseils d'expert et votre assistance.

Merci à Guy Beauchamp pour sa précieuse analyse statistique de nos données de recherche.

Merci aussi à Dr Derek Boerboom de m'avoir fait confiance pour manipuler son extraordinaire microscope digital.

Merci à mon copain, ma famille et mes amis qui m'ont supporté et ont compris mon indisponibilité durant cette aventure! Et particulièrement à Isabelle Bertrand pour avoir bien voulu prendre de son temps pour relire mon article et corriger ma prose anglophone.

RECENSION DE LITTÉRATURE

A. INTRODUCTION

Le trauma crânien est une des causes majeures d'invalidité, de mort et de coûts économiques pour la société (1). L'un des concepts primordiaux de la recherche sur le trauma crânien est que les dysfonctions neurologiques ne se présentent pas au moment de l'impact, mais progressent dans le temps sur une période de quelques heures à plusieurs jours (1). Plusieurs phénomènes pathophysiologiques s'en suivent, dont l'hémorragie intracérébrale qui est l'une des lésions les plus communes et les plus dévastatrices découlant du trauma crânien. De plus, les meilleurs résultats thérapeutiques sont obtenus lorsque les traitements réussissent à prévenir ou à atténuer ces lésions secondaires qui réduisent la perfusion cérébrale et sont un facteur pronostique important (1, 2).

D'ailleurs, les médecins et les familles des accidentés font face à une carence de traitements efficaces et de données de qualité sur le trauma crânien et l'hémorragie intracrânienne qui en résulte (3, 4). Il est donc difficile pour eux de choisir le meilleur plan d'action pour ces patients. Les lignes directrices actuelles sont plutôt vagues et focalisent principalement sur la prévention, la gestion aiguë lors de l'arrivée à l'hôpital, les précautions à prendre et les actions à ne pas prendre pour ne pas empirer le cas. Cependant, peu de recommandations mentionnent les meilleurs choix de soins intensifs et ceux à donner à long terme (3, 4).

En fait, il est très difficile d'avoir des réponses claires et précises concernant les répercussions et les traitements du trauma crânien puisque c'est n'est pas une maladie bien

définie, mais plutôt une condition multifacettes qui change beaucoup dans le temps. Beaucoup de recherches ont été effectuées dans ce domaine pour aider à trouver des réponses, cependant il reste encore beaucoup d'aspects du trauma crânien à élucider.

D'abord, l'hémorragie cérébrale lors du trauma crânien sera discutée pour saisir son importance autant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire. Pour bien la comprendre, les mécanismes pathophysiologiques primaires et secondaires, ainsi que l'impact de l'augmentation de la pression intracrânienne lors d'hémorragie intracérébrale et la neuroinflammation qui prend place après un certain temps, seront abordés. Dans un second temps, les trois principaux modèles animaux, utilisés en recherche pour élucider le trauma crânien et ses conséquences, seront expliqués. Ensuite, il sera question des différents tests comportementaux utilisés en recherche pour évaluer la fonction neurologique et motrice des rongeurs.

La douleur est l'un des aspects les plus négligés et les plus méconnus de l'hémorragie cérébrale (1). La prochaine section essaiera d'éclaircir le cas des céphalées lors du trauma crânien, ainsi que les mécanismes de sensibilisation qui y sont associés. De plus, différents moyens d'évaluer la douleur chez les animaux, en l'occurrence chez les rats, seront présentés. Finalement, les protocoles de traitements actuels du trauma crânien seront abordés, et les analgésiques, plus particulièrement les opioïdes, seront revus plus en détail.

Ceci dans le but de monter un projet de recherche visant à évaluer la douleur du trauma crânien chez le rat et son degré de soulagement avec l'utilisation d'analgésie, ainsi que les effets secondaires possibles de cette médication sur un cerveau présentant une hémorragie intracérébrale. Notre hypothèse propose que l'analgésie serait bénéfique pour les patients souffrant d'hémorragie intracérébrale sans causer de changements significatifs au niveau

cellulaire ou aux fonctions motrices. Notre objectif est de récolter des données plus précises sur le traitement des patients de trauma crânien, en utilisant différentes doses d'un analgésique et en faisant passer une série de tests neurologiques et moteurs à nos rats ayant subi une hémorragie intracérébrale, pour ensuite évaluer leurs cerveaux au niveau histopathologique, puis en analysant tous ces résultats.

B. HÉMORRAGIE CÉRÉBRALE LORS DE TRAUMA CRÂNIEN

Le trauma crânien est un problème important de santé publique qui compte pour 1,4 million de visites à l'urgence par année aux États-Unis (5). Le trauma crânien est défini comme un dommage crânien causé par l'impact à la tête d'une force externe qui dépasse la capacité du crâne à protéger le cerveau et qui est souvent accompagné de lésions intracérébrales. Cette force violente peut prendre plusieurs formes que ce soit un choc, un coup, un projectile ou bien une explosion (6). Chez les patients vétérinaires, le trauma cérébral peut survenir lors de plusieurs types d'incidents incluant les collisions avec des véhicules motorisés, des chutes, des blessures d'écrasement, des missiles, des attaques par d'autres animaux et aussi par des gestes humains, qu'ils soient volontaires ou fait par inadvertance (7-10). Selon la sévérité de l'impact, il peut provoquer des hémorragies, menant à des dysfonctions motrices, sensorielles ou cognitives, ou même la mort. L'étendue de ces dommages peut être temporaire, pour quelques jours, ou encore pour le reste de la vie du patient (11, 12). Traditionnellement, le trauma crânien était considéré comme une condition aiguë, mais il est maintenant reconnu que des symptômes chroniques sont associés à des lésions neurodégénératives. Ces manifestations progressives se présentent par des déficits moteurs et cognitifs, ainsi que par du stress, de l'anxiété et une altération du comportement

émotionnel (13). Le symptôme physique le plus commun du trauma crânien est le mal de tête, présent chez 25% à 90% des patients souffrant de trauma cérébral modéré (14). Une autre manifestation courante du trauma crânien est un large infarctus hémisphérique, aussi appelé infarctus cérébral malin, qui est associé avec les hémorragies cérébrales, une pathologie dévastatrice qui amène des déficits majeurs ainsi qu'un taux de mortalité élevé (15). Les traumas cérébraux sévères sont d'ailleurs généralement associés avec une haute mortalité chez les patients humains et animaux. Cependant, les chats et les chiens ont une habilité remarquable à compenser pour les pertes de tissus cérébraux, comparativement aux humains qui souffrent en plus de perte de leur qualité de vie (7, 16). Dans tous les cas, les cliniciens et les membres de la famille des victimes font souvent face à une pénurie de données cliniques pour traiter des lésions complexes situées dans un des tissus les plus délicats de l'organisme (3, 4).

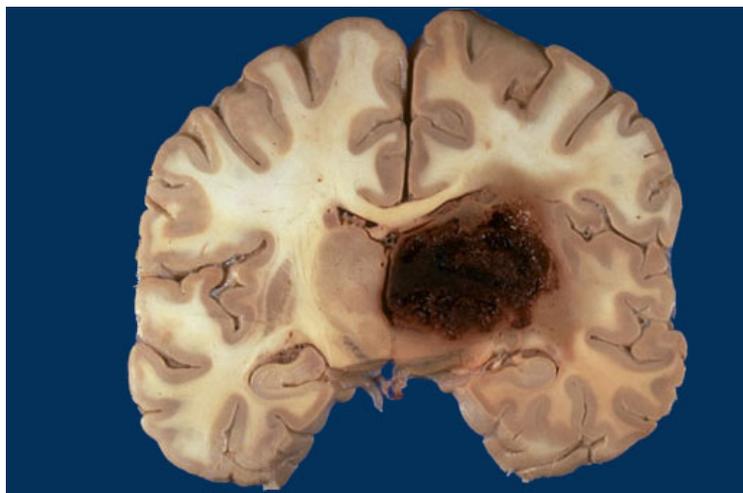


Figure 1. *Hémorragie dans un cerveau humain située dans les noyaux gris de la base. Un effet de masse déplaçant la ligne centrale, accompagné d'œdème cérébral controlatéral secondaire. Il est possible d'observer les dommages extensifs causés par l'hématome (Source : © Université de l'Utah, 2016) (17).*

1. Dommages primaires

Les dommages mécaniques infligés directement par l'impact initial sont définis comme lésions cérébrales primaires (8, 18). Ces lésions d'origine mécanique sont faites au tissu cérébral par un trauma direct et par les forces appliquées sur le cerveau au moment de l'impact. Cet évènement produit différentes forces sur le cerveau, dont l'accélération, la décélération et la force rotatoire. Le cerveau n'a pas la capacité de résister à ces forces à cause de sa composition et de l'absence de support interne (19-21). Ces lésions directes au cerveau peuvent être des contusions, des hématomes, des lacérations, des dommages axonaux diffus, des bris vasculaires menant à des hémorragies et de l'œdème cérébral vasogénique (7, 20). Les lacérations sont la lésion la plus sévère. Les hémorragies survenant après un trauma crânien peuvent être localisées de façon extra-axiale ou intra-axiale. L'endroit le plus commun où se retrouvent les hémorragies cérébrales traumatiques est à l'intérieur du parenchyme cérébral (intra-axial ex. les noyaux gris de base) ou encore dans l'espace sous-arachnoïdien (19, 20).

2. Dommages secondaires

Les lésions cérébrales secondaires apparaissent dans les minutes suivant le trauma, jusqu'à quelques jours suivant celui-ci. Elles sont le résultat de phénomènes systémiques extracrâniens et de changements intracrâniens (8, 18). Après l'impact, une cascade d'évènements biomoléculaires s'enclenche causant des dommages cérébraux progressifs et continus. La présence d'un hématome et d'œdème cérébral causé par les lésions primaires déforment le parenchyme du cerveau et diminuent le flot sanguin cérébral (19, 20). De plus, de multiples réactions cellulaires commencent lors de l'impact initial. Ces lésions cérébrales secondaires ont un effet significatif sur le pronostic final et peuvent mener à la nécrose et

l'apoptose des neurones et des cellules de la glie. Les principaux médiateurs des lésions secondaires impliquent la formation de radicaux libres, la libération d'acides aminés excitateurs, comme le glutamate, ainsi que l'oxyde nitreux (NO) (19) (10, 18, 20).

Lors de trauma crânien il y a une relâche massive de neurotransmetteurs activateurs augmentant drastiquement les activités métaboliques et la consommation d'adénosine triphosphate (ATP). Le manque d'énergie cellulaire qui s'ensuit entraîne un déséquilibre des ions et un influx incontrôlé de calcium et de sodium dans les neurones. S'ensuit un œdème cytotoxique ainsi qu'une dépolarisation des cellules qui mène à une relâche encore plus importante de neurotransmetteurs, comme le glutamate dans l'espace synaptique. Le glutamate surstimule les récepteurs NMDA des cellules nerveuses avoisinantes gardant ces récepteurs activés et entraînant une seconde accumulation de calcium dans les cellules qui active dans celle-ci des réactions enzymatiques, causant encore plus de dommages intracellulaires et mène finalement à l'apoptose (7, 8, 18, 20, 22).

La relâche de cytokines inflammatoires entraîne l'infiltration et l'accumulation de cellules inflammatoires. Ces médiateurs de l'inflammation activent l'acide arachidonique et la cascade de coagulation, ils perturbent la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique et entraînent la production d'oxyde nitreux. Ce dernier pourrait entraîner une vasodilatation excessive, empêchant ainsi la régulation de la pression. De plus, il contribue aux dommages faits par le glutamate et les dérivés réactifs de l'oxygène (10, 18, 20).

L'acidose tissulaire locale ainsi que l'hypoperfusion du parenchyme cérébral font partie des facteurs qui stimulent la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et de radicaux libres. Ces molécules s'attaquent principalement aux membranes cellulaires qui

contiennent un haut niveau de gras polyinsaturés et de cholestérol, et puisque le cerveau est un tissu riche en lipides, il est particulièrement sensible aux dommages oxydatifs (20, 23). De plus, lors d'hémorragie, le sang devient une source de fer supplémentaire pour la production de radicaux hydroxyles. Le consensus actuel indique que les dommages oxydatifs joueraient un rôle majeur dans les lésions cérébrales secondaires (7, 18, 20, 23, 24). Ce processus découle d'un cycle vicieux autoreproducteur qui mène à l'ischémie, aux infarctus, à l'œdème cérébral qui cause ultérieurement l'augmentation de la pression intracrânienne (19, 20).

3. Pression intracrânienne

La boîte crânienne est une structure rigide qui limite le volume qui peut se retrouver dans la cavité crâniale. Cet espace est principalement occupé par trois composantes : le parenchyme du cerveau, les méninges et vaisseaux, ainsi que le liquide céphalorachidien (7, 8, 19, 20, 25). Un changement dans l'une de ces composantes peut entraîner l'augmentation de la pression intracrânienne, qui est une séquelle commune et potentiellement mortelle du trauma cérébral (7, 18, 19, 24). Après un trauma crânien, le volume du contenu intracérébral peut augmenter dû à l'hémorragie, l'œdème ou encore l'accumulation de liquide céphalorachidien. Le mécanisme de compliance du cerveau est la capacité de ce dernier à s'ajuster à une élévation de la pression intracrânienne en diminuant le volume du fluide cérébrospinal et l'apport sanguin. Pendant cette période de compensation, les signes cliniques et vitaux du patient apparaîtront relativement normaux (7, 8, 19, 20, 25). Après le trauma, le flot sanguin cérébral est souvent significativement diminué à la suite de l'augmentation de la pression intracrânienne. Les facteurs qui influencent particulièrement cette diminution du flot sanguin cérébral regroupent l'œdème, l'hématome, la compression des vaisseaux sanguins par un effet

de masse et les vasospasmes. De plus, un accident sévère causant un trauma crânien peut généralement provoquer de l'hypotension et un choc systémique. La présence d'hypotension va par conséquent réduire encore plus le flot sanguin cérébral (7, 8, 19, 20, 25). Cette réduction causée par une pression intracrânienne élevée peut à son tour mener à l'ischémie. Pour prévenir ce phénomène, lorsque le flot cérébral diminue, des séries de réponses physiologiques se mettent en place. La réduction du flot sanguin aux centres vasomoteurs du tronc cérébral entraîne une diminution de l'élimination du dioxyde de carbone. L'accumulation des concentrations de dioxyde de carbone, hypercapnie, stimule le système nerveux sympathique à augmenter la pression artérielle moyenne (20). Cette série d'évènements mènera à une hypertension systémique, dans l'espoir de maintenir le flot sanguin au cerveau (7, 8, 19, 20, 25). Cependant, une fois que les barorécepteurs de l'aorte et des sinus de la carotide détectent l'hypertension systémique, ils envoient un signal aux centres vagues du tronc cérébral pour rétablir l'homéostasie; une bradycardie réflexe en résultera, c'est le réflexe de Cushing. L'hypertension systémique accompagnée de bradycardie sont donc des signes associés à l'augmentation de la pression intracrânienne chez les patients souffrant de trauma crânien (7, 8, 19, 20, 25). Subséquemment, une augmentation de la pression intracrânienne suivie d'une baisse de la pression de perfusion cérébrale provoque la relâche de catécholamines dans le sang. Le déferlement de ces neurotransmetteurs peut causer un syndrome cerveau-cœur, qui déclenchera des arythmies et de l'ischémie du myocarde (19, 20, 26). De plus, une fois les mécanismes de compliance épuisés, de petites augmentations du volume se manifesteront par des élévations drastiques de la pression intracrânienne, qui se traduiront par un déclin rapide du statut neurologique du patient. La capacité à compenser les changements de volume est plus efficace s'ils se font de façon lente et graduelle. Cependant, si

la pression intracrânienne continue d'augmenter, le risque d'une hernie du cerveau devient considérable (19). Ainsi, la pression intracrânienne est définitivement un facteur pronostic important, cependant d'autres processus se mettent aussi en branle, qui une fois hors de contrôle peuvent contribuer à la sévérité des dommages cérébraux; c'est le cas entre autres de la neuroinflammation.

4. Neuroinflammation

Lors de trauma crânien, les patients humains et animaux présentent un patron caractéristique d'une réponse neuroinflammatoire (27-29). Au moment de l'impact initial, les lésions cérébrales primaires entraînent une perte de neurones par nécrose. Ensuite, une cascade de lésions secondaires déclenche de l'excitotoxicité, du stress oxydatif, des dysfonctions mitochondriales, de la perturbation de la barrière hémato-encéphalique et de l'inflammation (30). Il s'en suit une réponse inflammatoire endogène qui est lancée pour défendre le site de lésion contre des agents pathogènes possibles et pour réparer les cellules endommagées. Le complément est ensuite activé pour assurer ces fonctions et recruter les cellules inflammatoires dans le compartiment intrathécal (31). L'activation du complément est aussi accompagnée en premier lieu de l'infiltration des neutrophiles puis plus tard par des monocytes et des lymphocytes à travers la barrière hémato-encéphalique (32). Ces cellules monocytaires sécrètent des prostaglandines, des radicaux libres, des cytokines pro-inflammatoires et d'autres médiateurs de l'inflammation qui régulent l'expression des chimiokines et des molécules d'adhésion cellulaire (32, 33). Ce processus a pour résultat la mobilisation de cellules immunitaires et microgliales dans le parenchyme cérébral (32).

Durant la période aiguë du trauma crânien, les mécanismes de neuroinflammation recrutent les cellules immunitaires et activent les astrocytes qui libéreront des cytokines et des chimiokines, ayant pour effet de protéger le site lésionnel (22), mais ces médiateurs de l'inflammation peuvent également interférer avec la capacité du cerveau à se réparer (34). Dans la phase chronique de la neuroinflammation, l'activation excessive des médiateurs inflammatoires contribue à créer un microenvironnement inflammatoire dans le cerveau qui participe à exacerber la mort cellulaire lors de trauma cérébral (22). En l'occurrence, les cellules microgliales locales et périphériques, ces dernières étant en fait des macrophages systémiques, coordonnent une réponse visant à protéger le cerveau, en séparant les tissus lésionnels des tissus sains pour limiter l'étendue des dommages (35). Cependant, l'activation des cellules microgliales, étant excessive lors de trauma cérébral, elle sera suivie d'une relâche massive de cytokines pro-inflammatoires, comme le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α), l'interleukine-1 β (IL-1 β), l'interleukine-6 (IL-6), l'interleukine-12 (IL-12) et l'interféron- γ (IFN- γ), ceux-ci participant à aggraver la lésion (12, 31). De plus, une activation soutenue des microglies produit des molécules neurotoxiques et encore plus de radicaux libres, ce qui mène à d'autres mécanismes secondaires de morts cellulaires (12, 36).

La microglie est la première catégorie de cellules inflammatoires à s'activer lors d'hémorragie intracérébrale, puisqu'elle est résidente du système nerveux central. Plusieurs molécules peuvent activer la microglie en quelques minutes après le dommage tissulaire, incluant l'ATP, les neurotransmetteurs, l'acide nucléique, les protéines de choc thermique (HSP) et le *high mobility group box 1* (HMGB1). Ce sont tous des composants relâchés dans l'espace extracellulaire lors de la mort des neurones (37). Ces molécules activent différents récepteurs de la microglie, comme les récepteurs de type Toll 4 (TLR4) et aussi les récepteurs

spécifiques des produits finaux de glycosylation avancée (RAGE) (38). Les TLR4 sont exprimés dans les cellules microgliales et sont activés rapidement après une hémorragie intracérébrale déclenchant l'activation subséquente des gènes pro-inflammatoires à travers le signal du facteur nucléaire- κ B (NF- κ B) (39, 40). Les composants du sang, tels que la fibrine, la thrombine et l'hème, qui se retrouvent dans le parenchyme après une hémorragie intracérébrale peuvent aussi déclencher le processus inflammatoire via la voie TLR/NF- κ B (40, 41). La thrombine peut aussi activer la microglie à travers le récepteur-1 activé par la protéase (PAR-1) et aussi par la voie de signalisation de la protéine kinase activée par des agents mitogènes (MAP-K) (42, 43). Une fois activée, la microglie produit des cytokines pro-inflammatoires destructrices comme le TNF- α , IL-1 β ou IL-6 et des enzymes pro-oxydantes comme l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) (44, 45).

Non seulement l'hémorragie elle-même amène des cellules inflammatoires sanguines, mais le processus de neuroinflammation initié par le trauma crânien augmente l'expression des molécules d'adhésion des leucocytes et de leurs ligands sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Ces molécules d'adhésion sont classées en trois types : les sélectines, les intégrines et la super famille des immunoglobulines (46, 47). Les leucocytes qui infiltrent ainsi le parenchyme cérébral produisent des cytokines pro-inflammatoires et des métalloprotéases matricielles (MMP) qui vont affecter encore plus la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (48-50). En fait, toutes substances qui influencent la réaction neuroinflammatoire vont à leur tour influencer l'intégralité de la barrière hémato-encéphalique et réciproquement. De plus, la microglie crée une communication croisée entre les cellules-T et la microglie grâce à la présentation d'antigène via l'expression du CMH-II (51). En plus de la population de cellules-T, il y a aussi infiltration dans le cerveau des lymphocytes T $\gamma\delta$ pro-

inflammatoires et des lymphocytes T régulateurs immunosuppresseurs (Treg) (52). Ces dernières pourraient jouer un rôle neuroprotecteur (53). La microglie contribue davantage à la neuroinflammation précoce en recrutant et en activant les leucocytes venant du sang déferlant dans le cerveau dû à l'hémorragie intracérébrale (51).

Mis à part les cytokines neurotoxiques, la microglie et les macrophages sécrètent des chimiokines comme les CXCL2 qui ont un pouvoir chimiotactique sur les neutrophiles qui exacerbent la réaction inflammatoire (54). Les neutrophiles utilisent des phagosomes contenant des composants digestifs et oxydatifs. Durant la phagocytose, ils produisent des fuites oxydatives qui stimule la relâche de ROS à partir de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase et myéloperoxydase (55). Bien que ces processus soient nécessaires pour une défense antimicrobienne, de hauts niveaux de ROS provoqués par l'activation de la microglie et l'infiltration de neutrophile contribuent à une destruction majeure des tissus cérébraux et à un pronostic sombre après une hémorragie intracérébrale (56, 57). Les neutrophiles vont entrer en apoptose environ 2 jours après avoir infiltré l'hématome (58). Les molécules qui sont relâchées suite à leur dégradation vont stimuler l'activation de la microglie et des macrophages encore plus et ainsi aggraver la neuroinflammation (59, 60).

Les astrocytes jouent aussi un rôle dans les processus de récupération lors de trauma crânien. En fait, ils régulent les facteurs neurotrophiques qui supportent et guident les axones dans leur rétablissement, ils favorisent la prolifération cellulaire, et promeuvent la survie à long terme des neurones en inhibant la mort cellulaire programmée (35, 61). Mais, lorsque les astrocytes deviennent hyperactifs, leur présence devient néfaste pour le cerveau. Bien qu'ils préservent les tissus cérébraux encore sains de l'environnement neurotoxique du site lésionnel,

ils interfèrent et préviennent aussi la régénération et la réparation des tissus endommagés, menant ainsi à des dommages cérébraux plus circonscrits, mais plus sévères (35).

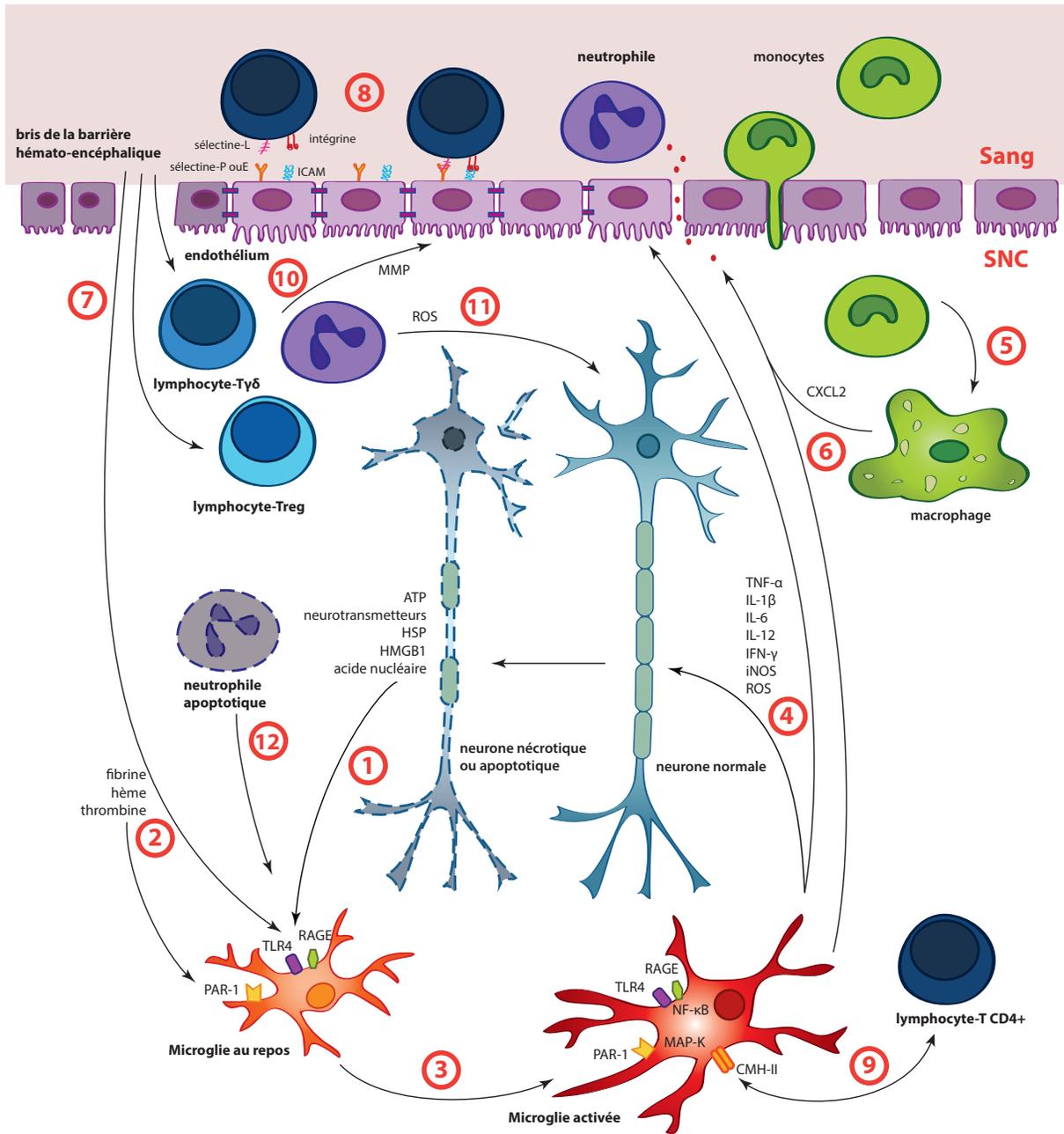


Figure 2. Mécanismes de la neuroinflammation.

[1] Lors de dommage tissulaire les neurones nécrotiques vont relâcher plusieurs molécules comme l'ATP, les neurotransmetteurs, les HSP, les HMGB1 et l'acide nucléaire qui vont activer la microglie par l'entremise des récepteurs TLR4 et RAGE.

[2] Lors d'hémorragie, les composants du sang tels que la fibrine, l'hème et la thrombine vont aussi activer la microglie via TLR4, mais aussi via PAR-1 à l'aide de la thrombine. [3] Les TLR4 vont activer les gènes pro-inflammatoires par le signal NF- κ B. Tandis que les PAR-1 vont utiliser la voie de signalisation MAP-K. [4] La microglie va alors produire et relâcher du TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ , iNOS et ROS qui vont aggraver la lésion en détruisant plus de neurones et en affectant la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. [5] Les monocytes qui infiltrent le parenchyme cérébral vont se transformer en macrophages dans l'environnement inflammatoire. [6] La microglie et les macrophages sécrètent des chimiokines comme les CXCL2 qui ont un pouvoir chimiotactique sur les neutrophiles. [7] Il y a infiltration de leucocytes venant du sang de l'hémorragie intracérébrale, notamment les neutrophiles, les lymphocytes T $\gamma\delta$ et les Treg. [8] La neuroinflammation augmente l'expression des facteurs d'adhésion endothéliale : les sélectines, les intégrines et les ICAM & VCAM, permettant l'invasion du parenchyme cérébrale par plus de leucocytes. [9] La microglie crée une communication croisée entre les cellules-T et elle-même grâce à la présentation d'antigène via l'expression du CMH-II. [10] Les leucocytes produisent des cytokines pro-inflammatoires et des MMP qui vont affecter la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. [11] Lors de la phagocytose des neutrophiles, il se produit des fuites oxydatives qui stimulent la relâche de ROS qui contribuent à la destruction des tissus cérébraux. [12] Lors de l'apoptose des neutrophiles, les molécules relâchées vont encore plus stimuler l'activation de la microglie et des macrophages. (Source : © Laurence Saine, 2017)

C. DIFFÉRENTS MODÈLES ANIMAUX

Il est nécessaire d'acquérir une meilleure compréhension de la pathophysiologie du trauma crânien et de l'hémorragie cérébrale qui en découle, pour développer des traitements plus efficaces contre cette condition. Ce processus de recherche repose en partie sur le choix d'un modèle animal approprié (62). Les modèles animaux de l'hémorragie intracérébrale ont grandement contribué à avancer notre savoir sur la pathophysiologie de cette maladie et sont

communément employés pour développer et tester les nouvelles stratégies thérapeutiques dans un contexte clinique (63). Le type de modèle choisi doit créer une lésion cérébrale stable et contrôlable avec un degré de précision élevé. En plus, de pouvoir être quantifiable et facilement répétable, un bon modèle de trauma crânien doit être assez fiable et exact pour satisfaire les divers degrés de modifications nécessaires selon les besoins de la recherche (64). Les lésions neuronales associées à l'hémorragie intracérébrale étaient autrefois considérées comme une insulte statique causée par l'effet de masse du caillot sanguin et par la suite par le développement d'une pénombre ischémique. Durant la dernière décennie, les modèles précliniques ont fourni une grande quantité d'informations au sujet des lésions secondaires impliquées dans l'hémorragie cérébrale (65-70). Ces données suggèrent une évolution plus complexe des processus de destruction, ces derniers pouvant être la cible des nouvelles modalités thérapeutiques. Le terme neuroinflammation désigne l'inflammation du cerveau lorsque celui-ci est exposé aux composés immunitaires du sang. Les modèles animaux actuels ont fourni de nombreuses évidences d'une réponse inflammatoire sévère lors d'hémorragie cérébrale, incluant la relâche de cytokines, l'activation des microglies, l'activation des astrocytes, la cascade inflammatoire et l'apoptose (65). La recherche sur le trauma crânien et l'hémorragie cérébrale a recours présentement à de nombreux modèles animaux pour étudier les différents aspects de la pathophysiologie (65). Les modèles les plus utilisés actuellement sont l'injection de sang entier, l'impact cortical contrôlé et l'injection de collagénase, les deux derniers étant beaucoup plus répandus.

1. Injection de sang entier

La méthode impliquant l'injection de sang entier autologue est disponible depuis les années 80 et a été utilisée sur plusieurs espèces (65). La technique employée pour ce modèle débute par l'insertion d'une aiguille à l'aide d'un appareil stéréotaxique dans une région spécifique du cerveau de l'animal anesthésié. Ensuite, un volume prédéterminé de sang autologue est injecté sur une période de temps spécifique, produisant par le fait même un volume hémorragique constant (65). Initialement, le modèle d'injection de sang entier n'utilisait qu'une seule injection (71), mais il produisait parfois des résultats irréguliers à cause du reflux de sang dans l'aiguille (72). Pour minimiser cette complication, une méthode à double injection a été développée, durant laquelle une petite quantité de sang est injectée juste au-dessus de l'endroit visé pour l'expérience, suivit ensuite de l'injection principale de sang entier dans la région ciblée. Le sang coagulé de la première injection prévient le reflux dans l'aiguille (73). Ce modèle imite la formation rapide d'un hématome cérébral, mais il ne provoque pas la rupture à proprement parler de vaisseaux sanguins cérébraux (63). Cependant, un avantage majeur de cette technique est qu'il n'utilise pas de facteur confondant extérieur pour induire l'hémorragie intracérébrale, comme des protéines exogènes (63). Le désavantage évident de cette technique est qu'elle ne reproduit pas la rupture des petits vaisseaux sanguins, phénomène qui est considéré comme la cause de la vaste majorité des hémorragies intracérébrales chez les humains (65). Le modèle d'injection de sang entier permet cependant de faire des comparaisons pertinentes au niveau clinique par rapport aux effets mécaniques strictement dus à la présence de sang dans le parenchyme du cerveau, cependant il n'offre pas l'opportunité d'évaluer les récurrences des saignements intracérébraux ni de l'effet de la rupture de la microcirculation (65). De plus, les déficits fonctionnels engendrés par les lésions causées

par le modèle d'injection de sang entier se rétablissent plus rapidement et plus entièrement qu'avec d'autres modèles (62).

2. Impact cortical contrôlé

La méthode de l'impact cortical contrôlé est un modèle utilisé pour les expérimentations sur le trauma crânien. Elle utilise une interface d'impact dont il est possible de contrôler et de mesurer la vitesse et la compression corticale (74). Après une craniotomie, un dispositif contrôlé par ordinateur et équipé d'un « marteau » actionné par un solénoïde avec une pointe en acier de 3,0 mm de diamètre, le tout installé sur un appareil stéréotaxique, fait impact avec la tête et la dure-mère du rat (64).

Ce modèle animal produit des contusions corticales reproductibles et mesurables, ainsi qu'un coma fonctionnel et des lésions axonales extensives. Ces variables contrôlées permettent de déterminer précisément le degré de déformation, ainsi que les changements dans le temps (74). Avec le modèle d'impact cortical contrôlé, il est possible de modifier les données de la déformation des tissus et de la vitesse de contact en changeant la configuration de l'embout du marteau, la pression de l'air ou le niveau de déformation. De plus, la quantité de déplacement de tissus peut être calculée en connaissant la dimension de la pointe d'impact, qui est une constante. Les analyses des différents paramètres de cette méthode pourront mener éventuellement à la compréhension de l'interaction entre les différentes variables physiques, la sévérité des dommages physiologiques, ainsi que les issues fonctionnelles (74).

L'impact cortical contrôlé a l'avantage de provoquer de petites lésions mesurables avec exactitude, en plus de sa grande répétabilité et du fait qu'il est moins affecté par les divers facteurs individuels. Il permet donc de produire un modèle de trauma crânien stable et

quantifiable, qui supplante le caractère aléatoire des anciens modèles (64). Actuellement, le modèle d'impact cortical contrôlé est utilisé largement dans le domaine de l'expérimentation du trauma crânien. Il est un outil important pour quantifier les différents degrés de lésions chez les rongeurs en changeant la profondeur de l'impact, la portée de l'impact et la vitesse (27, 75). Cependant, pour l'instant il n'y a aucune normalisation des paramètres produisant les divers degrés de lésions comme référence. De plus, il est difficile de contrôler l'effet de la lésion de façon précise particulièrement par rapport à la vitesse et le temps d'action. Aussi, les lésions sont surtout au niveau cortical affectant peu les tissus profonds ce qui limite les applications (64).

3. Injection de collagénase

La technique d'injection avec de la collagénase bactérienne a été introduite par Rosenberg *et al.* dans le début des années 90 (76). L'hémorragie cérébrale produite dans les noyaux gris de la base par l'injection de collagénase est un modèle animal facilement reproductible pour l'étude des effets d'un hématome intracérébral et de l'œdème du cerveau (76). L'avantage de ce modèle est sa simplicité et sa constance, la taille de l'hémorragie qui est dose-dépendante et son adaptation aisée à diverses espèces (77).

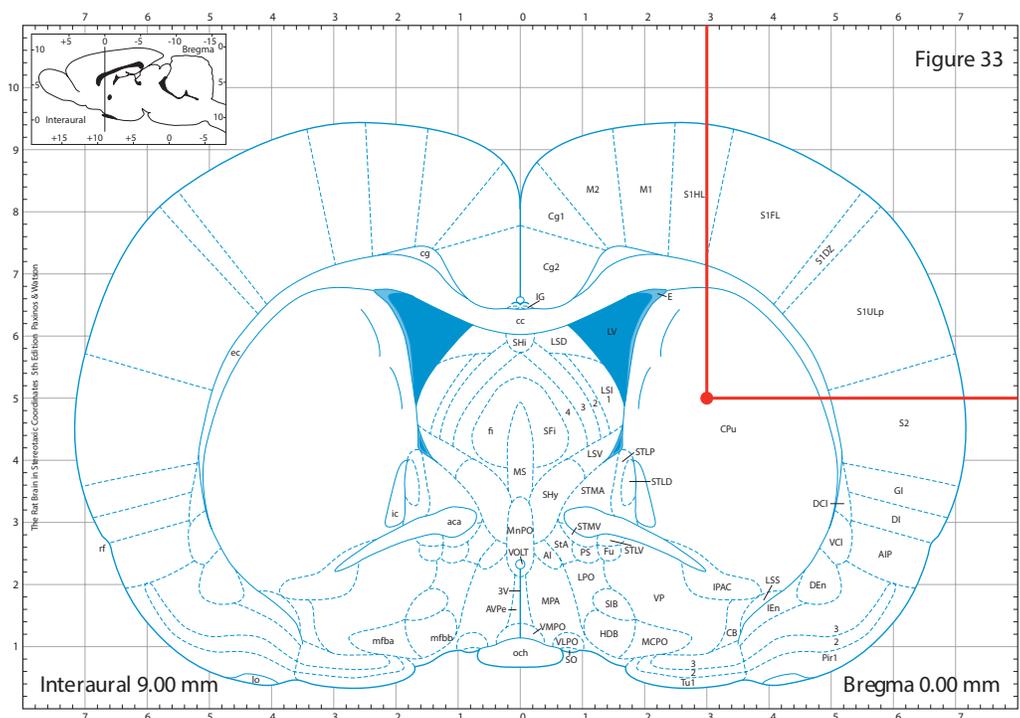


Figure 3. *Noyaux gris de la base (caudoputamen) dans le cerveau du rat.*

Cette figure illustre l'anatomie du cerveau du rat aux coordonnées stéréotaxiques utilisées dans cette expérience (point rouge), centrées sur bregma comme référence : antéro-postérieure 0,0 mm, latéral 3,0 mm et profond 5,0 mm (Figure modifiée : © Paxinos & Watson, 2006) (78)

La procédure consiste à placer l'animal, souvent un rongeur, dans un appareil stéréotaxique et après une craniotomie, il y a injection dans les coordonnées prédéterminées du cerveau de quelques microlitres de saline contenant généralement de 0,1 à 0,5 unité de collagénase bactérienne type VII, essentiellement exempte de protéase (76). Des études récentes montrent que la collagénase de type IV fonctionne également très bien et donne des résultats similaires, bien qu'elle semble causer une lésion plus importante et donc la concentration devrait être revue légèrement à la baisse si on compare aux résultats des premières études (79).

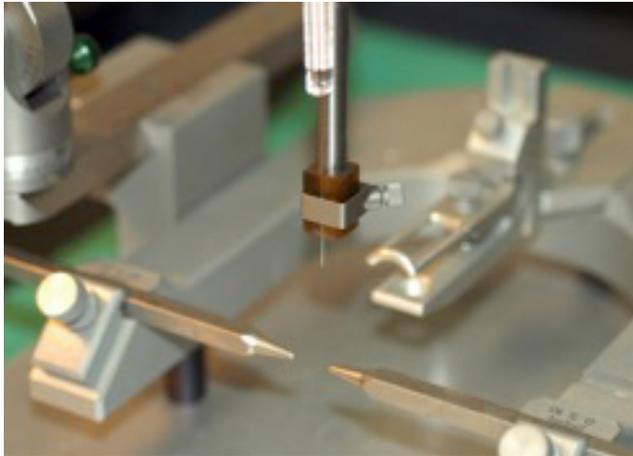


Figure 4. *Appareil stéréotaxique.*

Appareil stéréotaxique avec seringue 5 μ L en verre attachée au-dessus de la barre d'incisives et barres d'oreilles. (Source image gauche : © Laboratoire du Dr P. Vachon, Faculté de médecine vétérinaire, UdeM ; source image droite : © Phymep) (80)

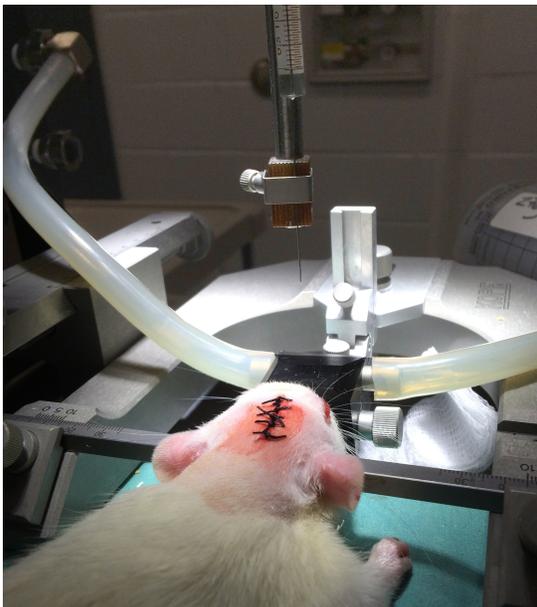


Figure 5. *Rat dans un appareil stéréotaxique.*

Rat à la fin de la chirurgie avec points de suture en soie sur le crâne. L'aiguille et la seringue utilisées pour l'injection de collagénase sont visibles au-dessus de la tête du rat (à gauche). Le tuyau amène le gaz anesthésique dans le masque où repose le nez du rat. Les barres d'oreilles fixent le crâne en place. (Source : © Laboratoire du Dr P. Vachon, Faculté de médecine vétérinaire, UdeM)

La collagénase endogène est une composante inactive qui se retrouve dans les cellules endothéliales et les neutrophiles; elle est relâchée et activée lors de lésions (81). Le collagène est un élément fondamental de la membrane basale de la barrière hémato-encéphalique, donc la collagénase étant une protéase qui a comme propriété la lyse de la matrice extracellulaire autour des capillaires cérébraux, elle les affaiblit et cause la rupture des vaisseaux sanguins résultant en une hémorragie (62, 65, 81, 82). Les saignements actifs engendrés par la perturbation de la membrane basale des vaisseaux capillaires du cerveau évoluent généralement sur plusieurs heures (62). L'injection de collagénase bactérienne cause des déficits neurologiques reproductibles, de même que l'augmentation significative de la teneur en eau du cerveau dans le cortex ipsilatéral et dans les noyaux gris centraux jusqu'à 72 heures après la procédure chirurgicale (63, 65). La teneur en eau du cerveau augmente significativement après 4 heures, puis encore à 24 et 48 heures au site d'infusion de l'aiguille, ainsi que pour une période de 24 heures dans la section postérieure du cerveau. Il est ensuite possible de quantifier cet œdème cérébral, ainsi que les déficits neurofonctionnels provoqués par l'hématome (63).

Le modèle de collagénase prouve sa pertinence clinique en intégrant le concept de la rupture des petits vaisseaux pour produire une hémorragie cérébrale et en permettant une variabilité dans la taille des hématomes facilement contrôlable et reproductible. En fait, quatre heures après l'injection, la formation d'un hématome cérébral est perceptible et la taille dépend de la quantité de collagénase bactérienne injectée (76). Il permettrait aussi d'imiter le phénomène de saignements intermittents qui est observé dans les cas humains (65). Cependant, les hémorragies intracérébrales induites par l'injection de collagénase sont soupçonnées de produire une destruction plus importante de la barrière hémato-encéphalique,

ainsi que plus de dommages cérébraux (62). En effet, la collagénase bactérienne crée en elle-même une réponse inflammatoire qui est plus intense que le modèle par injection de sang entier (83). Certains croient qu'elle est donc plus représentative de la réalité de l'hémorragie cérébrale, mais d'autres sont d'avis que la collagénase produit une réponse inflammatoire exagérée et qu'elle pourrait être directement toxique pour les neurones (73, 82). Les analyses histologiques démontrent la présence d'érythrocytes autour des vaisseaux sanguins au site d'insertion de l'aiguille une heure après l'injection (76). Des régions de nécrose contenant du plasma, des globules rouges, des neutrophiles et de la fibrine peuvent être observées après 24 heures. L'infiltration de neutrophiles se trouve principalement à la périphérie de l'hémorragie, et on retrouve des cellules gliales réactives et des neurones nécrotiques dans la région de la pénombre (76, 84-86). Après 48 heures, la zone périphérique se compose d'un intense infiltrat de leucocytes polymorphonucléaires (76). L'induction d'un hématome intracérébral avec l'injection de collagénase est généralement accompagnée de vasculites qui sont caractérisées par une infiltration de cellules inflammatoires, de dépôts de fibrine et la perte d'intégrité des parois vasculaires (85, 86). De plus, des macrophages remplis de myéline sont présents à partir de 7 jours et forment des vésicules après trois semaines (76).

Certains patients souffrant d'hémorragie cérébrale n'auront qu'un seul épisode significatif de saignement, mais la plupart verront l'hématome prendre de l'expansion durant la première journée (87). Par conséquent, le modèle d'injection de collagénase est plus approprié pour évaluer les traitements qui affectent les saignements et l'expansion de l'hémorragie, comme les thérapies hémostatiques (63, 88). D'ailleurs, la progression des lésions de ce modèle s'étend sur un plus longue période de temps le rendant plus apte pour les études sur les résultats à long terme ainsi que les effets secondaires de la médication (62, 89).

De plus, la récupération de la détérioration fonctionnelle est beaucoup plus graduelle et incomplète dans le modèle à injection de collagénase que dans les autres modèles et ce malgré une dégénérescence similaire au départ (62, 90). En effet, le modèle à collagénase produit des déficits moteurs et cognitifs bien perceptibles pendant les premières 48 heures chez les rats adultes, qui s'améliorent graduellement pendant la première semaine (76) pour ensuite continuer d'évoluer sur une période de 10 semaines. L'évaluation de ces changements comportementaux fournit une base solide pour les études de stratégies de traitements (91). De plus, puisque ces déficits sont observés à long terme, il est donc un excellent modèle pour évaluer les différentes approches thérapeutiques qui visent à restaurer les fonctions neurologiques après une hémorragie intracérébrale (92). Il y a aussi les crises de convulsions qui sont des complications fréquentes du trauma crânien, incluant les hémorragies intracérébrales; en fait ces crises sont observées chez un tiers des patients (93). D'ailleurs, des convulsions ont été observées dans certaines études jusqu'à 66% des groupes de rat injectés avec de la collagénase entre 10 et 36 heures, aucun signe de ce genre n'est présent chez les groupes injectés avec du sang entier (94). L'injection de collagénase est donc un modèle animal plus fidèle sur plusieurs aspects à la réalité des patients humains souffrant d'hémorragie intracérébrale suite à un trauma crânien.

D. TESTS COMPORTEMENTAUX

Il existe plusieurs tests comportementaux pour évaluer l'état du système nerveux des animaux. Un examen neurologique sommaire permet de collecter de l'information sur les déficits neurologiques à plusieurs niveaux du système nerveux central. Même si cet examen est moins sophistiqué chez le rat, il est utile pour évaluer globalement les capacités motrices et

comportementales de l'animal (95). Ces tests sont particulièrement bien adaptés pour évaluer les dommages causés par l'ischémie cérébrale.

1. Tests semi-quantitatifs

Certaines publications (84, 96, 97) ont utilisé des tests semi-quantitatifs permettant d'évaluer sur une échelle numérique les comportements normaux aux comportements anormaux. Parmi ceux-ci on retrouve les 9 paramètres utilisés dans cette expérience: l'activité (exploration de l'environnement immédiat au moment où le rat est placé sur une nouvelle surface dure); la locomotion (le rat est placé dans un corridor de marche et la progression vers l'avant est évaluée); le positionnement visuel (le rat est tenu par la queue au-dessus d'une surface de contact et il est déplacé vers cette surface dure, la symétrie du positionnement des deux membres est évaluée); la passivité positionnelle (suite à une contention manuelle, les membres postérieurs, de façon alternée, sont étirés pour les éloigner de l'animal et la réponse motrice de retrait est évaluée); la facilité de grimper (le rat grimpe sur un grillage et l'habileté et la symétrie des membres antérieurs sont évaluées); la rigidité de la queue (la queue est élevée à mi-longueur et sa rigidité est observée); les tremblements (le rat est tenu par la queue dans une position élevée tout en gardant les membres antérieurs en contact avec une surface dure pour une période de quelques secondes, la stabilité des membres postérieurs est observée); l'hypertonie (le rat est tenu par la queue dans une position élevée tout en gardant les membres antérieurs en contact avec une surface dure pour une période de quelques secondes, la tonicité des membres postérieurs est alors observée); le sautiller (le rat est retenu par les membres postérieurs et une patte antérieure, le poids entier de l'animal repose

donc sur un seul membre. Le rat est déplacé latéralement et le sautillement est évalué pour juger l'ajustement postural).

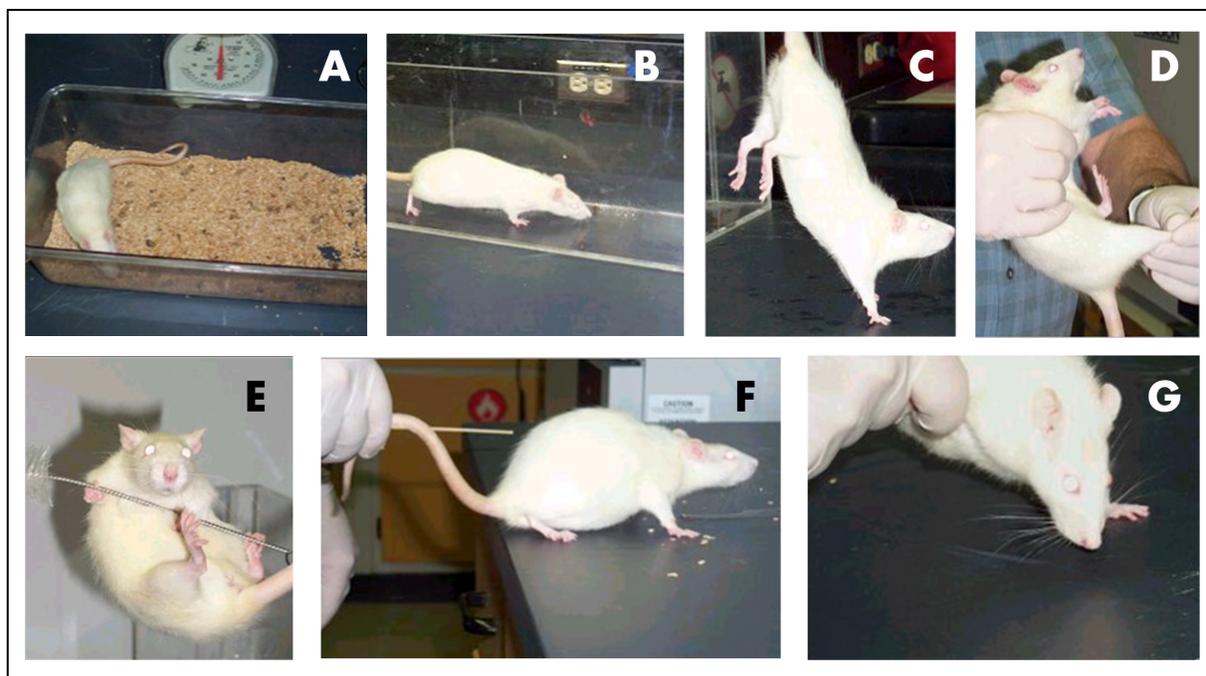


Figure 6. Examen neurologique.

Pour l'examen neurologique le positionnement de chacun des tests est représenté ci-dessus. A : activité; B : locomotion; C : positionnement visuel, tremblements, hypertonicité; D : passivité positionnelle; E : facilité à grimper; F : rigidité de la queue; G : Sautillement. (Source : © Laboratoire du Dr P. Vachon, Faculté de médecine vétérinaire, UdeM)

2. Rotarod

Le Rotarod est aussi un test comportemental utilisé pour évaluer la fonction motrice des rongeurs. Les rats sont déposés sur un cylindre rotatif qui les oblige à avancer pour ne pas tomber et qui accélère de 2,5 à 25 rotations par minute pendant 5 minutes maximum (86). Les paramètres mesurés sont la durée (secondes) de leur performance avant qu'ils ne tombent, l'évaluation de l'équilibre, la force préhension et la coordination motrice des sujets, ces

données sont particulièrement utiles lors d'expérimentations compilant les effets de drogues ou après des traumatismes crâniens (98).

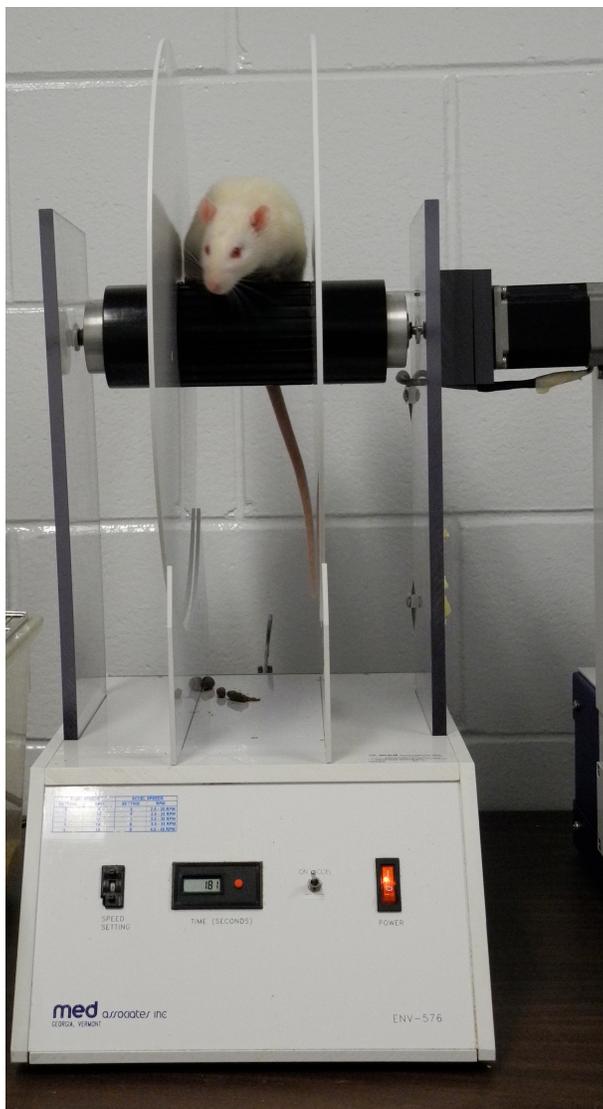


Figure 7. *Le rotarod.*

Le rat est placé sur le cylindre rotatif et doit suivre la cadence pour ne pas tomber. La vitesse augmente graduellement sur une période de 5 minutes. Des murs sont placés de chaque côté pour qu'il se déplace uniquement vers l'avant. Le rotarod est muni d'un chronomètre en secondes qui s'arrête une fois que le rat tombe du cylindre. La performance motrice du rat est ainsi évaluée avant et après le trauma crânien. (Source : © Laboratoire du Dr P. Vachon, Faculté de médecine vétérinaire, UdeM)

3. Test de la poutre

Finalement, le test de la poutre statique et le Rotarod permettent d'évaluer la fonction motrice des rongeurs. Le test de la poutre consiste en un goujon de bois de 60 à 100 cm, placé au-dessus (approximativement 25 cm) d'un espace ouvert. Le rat doit se déplacer tout le long de la poutre sans tomber. Un tube de PVC est placé à l'extrémité de la poutre pour motiver le rat à avancer (99). Ce test demande beaucoup d'équilibre et de coordination motrice fine et il expose facilement les problèmes des membres déficients. Le temps de la traversée est généralement mesuré et les pertes d'équilibre sont notées. Si l'animal est incapable de traverser sans tomber, la distance parcourue avant la chute est alors notée (100).



Figure 8. *Test de la poutre.*

Le rat avance sur un goujon gradué en centimètre qui permet de mesurer son déplacement, il se dirige vers un tube en PVC qui lui sert de cachette (non visible sur la photo). Le temps de déplacement est enregistré par l'observateur. Les pertes d'équilibre ou les chutes sont aussi notées. (Source : © Laboratoire du Dr P. Vachon, Faculté de médecine vétérinaire, UdeM)

E. DOULEUR

1. Douleur du trauma crânien

La douleur aigüe est soudaine et vive et sert de mécanisme de défense pour éviter des situations dangereuses pour le corps (101). Il existe une multitude de méthodes dans les diverses formes de médecine pour prévenir et soulager la douleur; elles sont pour la plupart accessibles et faciles à utiliser, mais elles sont souvent soit mal connues ou utilisées inadéquatement (102, 103). Chez l'humain, l'intensité de la douleur aigüe est souvent modérée et momentanée, cependant elle peut aussi être sévère et perdurer pour des semaines ou des mois, c'est alors une douleur chronique. Dans la plupart des cas, la douleur disparaît avant 3 mois lorsque la cause sous-jacente est éliminée. Cependant, la douleur non soulagée peut mener à de la douleur chronique lorsqu'elle perdure plus de 3 mois (101). Il est important de traiter la douleur, non seulement pour prévenir la douleur chronique, mais aussi pour aider au rétablissement du patient. En effet, lorsqu'il y a un dommage aux tissus, les nocicepteurs sont stimulés. Les signaux de douleur engendrés sont ensuite transmis à la moelle épinière vers les centres supérieurs du cerveau où ils vont activer la « réponse de stress » chez l'individu. Lors de cette réponse de stress, la stimulation du système nerveux sympathique et la relâche de certaines hormones vont provoquer des changements cardiovasculaires, endocriniens et métaboliques (104). Les modifications impliquent de profonds changements physiologiques qui normalement prépareraient l'individu pour une situation de survie à court terme « combat ou fuite », mais dans un contexte clinique cette réponse de stress n'a plus aucune utilité. En fait, tous ces changements auront l'effet contraire, puisqu'ils provoquent des conséquences adverses qui vont résulter en une augmentation de la morbidité des patients, du prolongement

du temps d'hospitalisation et même ultimement de la mortalité. Les mécanismes de la réponse de stress peuvent impliquer des hémorragies, des infections, de la perte de chaleur, de l'anorexie, de l'anxiété, de l'hypoxie, des déséquilibres acido-basiques et un certain degré de dommage tissulaire (104). Le soulagement de la douleur devrait donc toujours faire partie du protocole de traitement. Ne pas traiter la douleur peut être dangereux dans certains cas et est inacceptable. La douleur, qu'elle soit postopératoire ou traumatique, peut retarder la guérison et contribuer aux complications qui peuvent conduire à la mort. Une bonne gestion de la douleur promeut la guérison rapide et diminue le temps d'hospitalisation, les admissions et les réadmissions (101).

Lors d'un trauma crânien, la douleur ressentie par le patient peut provenir de plusieurs sources. Il y a bien sûr les autres contusions qui peuvent être présentes selon le contexte de l'accident, mais un aspect qui est souvent négligé est la douleur rattachée à la boîte crânienne elle-même. La douleur peut venir des dommages reliés au trauma crânien, mais aussi à la pression intracrânienne et l'ischémie qui sont présentes lors d'hémorragie cérébrale.

a) Migraines chroniques

Selon l'*International Classification of Headache Disorders* (ICHD-II), il peut y avoir apparition de maux de tête post-traumatiques de façon aiguë ou même chronique chez les patients humains qui souffrent généralement de trauma crânien modéré à sévère ou même parfois léger (105). Ces maux de tête se développent généralement rapidement après le trauma et ressemblent beaucoup cliniquement à un mal de tête primaire (106), particulièrement au type céphalée de tension; ils peuvent aussi survenir plus tard après l'accident (107). Les maux de tête sont un des types de douleur les plus communs chez l'espèce humaine, cependant ils sont à peine reconnus en médecine vétérinaire, dû à la difficulté à établir et reconnaître les

signes cliniques liés aux céphalées chez les animaux (108). Lors du trauma crânien, sans compter les os du crâne et les tissus le recouvrant, la douleur peut provenir des artères et sinus associés à la dure-mère, les grosses artères intracrâniennes et le plexus choroïde (108). En effet, bien que le cerveau soit la structure qui subit le plus de dommages dans ce contexte, celui-ci n'a pas de récepteurs de douleur et donc une lésion invasive du parenchyme cérébral n'est pas douloureuse en tant que telle, la douleur provenant alors des fibres nerveuses bordant les parois des vaisseaux sanguins ou par les chemins afférents de la douleur qui pénètrent dans le cerveau (108). Les causes des maux de tête sont l'inflammation, la traction, le déplacement et la distension des structures sensitive de la tête (109). Donc, les céphalées peuvent résulter soit d'une traction sur les veines et les sinus du crâne, soit d'une traction sur les artères méningées, ou d'une traction sur les grosses artères à la base du cerveau, ou d'une distension et dilatation des artères intracrâniennes et extracrâniennes, ou bien d'une inflammation près des fibres nerveuses qui bordent les vaisseaux de la tête, ou encore de la pression sur les nerfs contenant les fibres de douleur afférentes. Cinq types de maux de tête peuvent provenir de l'inflammation ou d'une stimulation mécanique des récepteurs neurovasculaires du crâne : les céphalées causées par un composé chimique tel que l'histamine et le nitrile d'amyle, les migraines, les maux de tête associés à la fièvre ou une septicémie, les céphalées post-convulsions et les maux de tête associés à l'hypertension. En effet, la dilatation des vaisseaux lors d'hypertension produit de la pression sur les parois des artères et des tissus en périphérie; ce mécanisme a été testé en manipulant la pression artérielle (108).

Lorsque la pression intracrânienne est élevée, le fluide cérébrospinal diminue de volume dans le crâne comme mécanisme de compensation. Si le liquide céphalorachidien ne peut être évacué à cause d'un blocage ou d'une constriction, la pression intracrânienne ne peut

plus se rééquilibrer et va même augmenter, exacerbant ainsi les maux de tête, la nausée, les vomissements et l'acouphène. Les céphalées produites par les traumatismes crâniens sont généralement de nature pulsatile et peuvent causer des nausées, de la sensibilité à la lumière et de la somnolence. Lorsque ces symptômes sont détectés, il est fort probable qu'il y ait augmentation de la pression intracrânienne; il est à noter que les hémorragies épidurales, sous-durales et sous-arachnoïdiennes peuvent produire ce genre de maux de tête (108). Les céphalées causées par l'augmentation de la pression intracrânienne sont observées chez 51,5% des patients ayant une hémorragie cérébrale. La durée moyenne de ces maux de tête est de 64 heures (110).

Les patients souffrant de désordres cérébrovasculaires sont communément atteints de maux de tête (111). En effet, les hémorragies situées dans le parenchyme du cerveau sont souvent associées à la survenue de maux de tête secondaires (111). D'ailleurs, les céphalées sont rapportées chez 33-88% des patients au moment de l'apparition de l'hémorragie cérébrale (112). Cependant, la fréquence de ces maux de tête dépend de la localisation, ainsi que de la taille de l'hémorragie primaire (113). L'apparition et la sévérité dépendent aussi de la localisation et de la taille, mais aussi de la vitesse d'évolution (113). Chez les patients souffrant d'hémorragies cérébrales, les maux de tête sont reliés à l'effet de masse causée par l'accumulation de sang dans le parenchyme créant une distension, une distorsion, une déformation ou un étirement des structures intracrâniennes locales sensibles à la douleur (114). Les céphalées peuvent aussi être provoquées par le déchirement des parois vasculaires et de ses terminaisons nerveuses à l'endroit où l'hémorragie débute (111).

2. Mécanismes de sensibilisation

Lors de maux de tête, particulièrement lors de migraines, des mécanismes de sensibilisation à la douleur se mettent en place durant les premières phases d'installation de la condition. Le développement des pulsations dans la phase initiale de la migraine est régi par la sensibilisation des neurones périphériques trijumeau-vasculaires qui innervent les méninges (113). La création et le maintien d'une allodynie cutanée qui se développe plus tard durant l'attaque migraineuse, est aussi causée par la sensibilisation des neurones trijumeau-vasculaires qui reçoivent des influx sensoriels à partir des méninges, mais aussi de la peau de la région faciale et du scalp (113).

a) Neurones trijumeau-vasculaires de premier ordre

La sensibilisation du neurone trijumeau-vasculaire de premier ordre est responsable de la douleur pulsatile. En effet, l'activation des fibres C méningées provoque la sécrétion de peptides apparentés à la calcitonine (CGRP) par les branches périphériques de ces fibres sensibles (115). Ce neuropeptide a la capacité d'initier l'inflammation neurogénique dans la dura (116, 117). Il est aussi responsable du relâchement extracellulaire d'agents de l'inflammation tels que l'histamine, la sérotonine, la bradykinine et les prostaglandines (113). Normalement insensibles aux stimuli mécaniques, les nocicepteurs méningiaux du ganglion trijumeau deviennent mécanosensibles après plusieurs minutes d'exposition aux stimuli chimiques de la dure-mère (118). Alors, la moindre pression mécanique devient suffisante pour induire une activité dans les neurones sensibilisés (113). Une fois que les nocicepteurs méningiaux sont sensibilisés, ils deviennent réactifs aux plus petites fluctuations de la pression intracrânienne produites par les pulsations artérielles normales du flot sanguin (113). Lors

d'un épisode de migraine, cette hypersensibilité mécanique est responsable des pulsations du mal de tête et son aggravation pendant la toux ou toutes activités physiques qui augmentent la pression intracrânienne (113). Normalement, les neuropeptides vont être métabolisés après environ 24h, mais si la stimulation nociceptive revient avant la dégradation des peptides alors ce processus peut se reproduire par épisodes répétés sur une courte période. Les effets surviennent donc rapidement et sont amplifiés puisque les conditions sont déjà réunies et que la sensibilisation est toujours présente. C'est ce que l'on appelle des migraines chroniques, particulièrement si elles surviennent plus de quinze fois par mois (119).

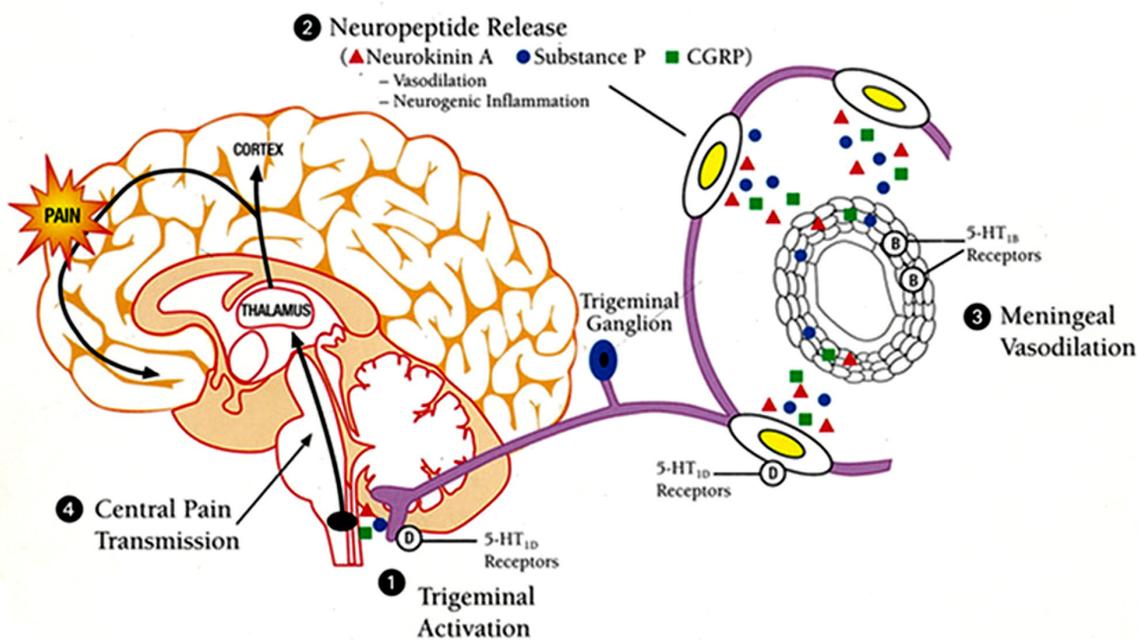


Figure 9. *Quatre phases de la migraine.*

Phase 1, activation du neurone trijumeau-vasculaire. Phase 2, après 20-40 minutes il y a décharge des neuropeptides et des agents de l'inflammation. Phase 3, après environ 2h il y a vasodilatation des vaisseaux méningiaux. Phase 4, après 3h le thalamus est activé et inflammé, c'est le centre de douleur du SNC, la sensibilisation est déclenchée. Puisque les migraines sont épisodiques, le processus s'arrête en 4-72 heures. (Source : © Daniel, 2013) (119)

b) Neurones trijumeau-vasculaires de deuxième ordre

La sensibilisation des neurones trijumeau-vasculaires de deuxième ordre entraîne quant à elle l'allodynie cutanée (113). Les agents de l'inflammation, libérés lors de la phase initiale, activent non seulement les neurones de la corne dorsale (120, 121), mais les sensibilisent aussi pour une période pouvant s'étendre jusqu'à 10 heures (122). Les neurones sensibilisés dans la médulla démontrent une réactivité augmentée à des stimuli mécaniques du champ de perception duraie, mais aussi aux stimuli thermiques du champ de perception cutanée. Leur seuil de réponse diminue, tandis que l'ampleur de la réponse augmente. Les migraines associées à de la sensibilisation centrale, manifestent cliniquement de l'hypersensibilité sensorielle extracrâniale, comme la peau des tempes ou celle de la région périorbitale (113).

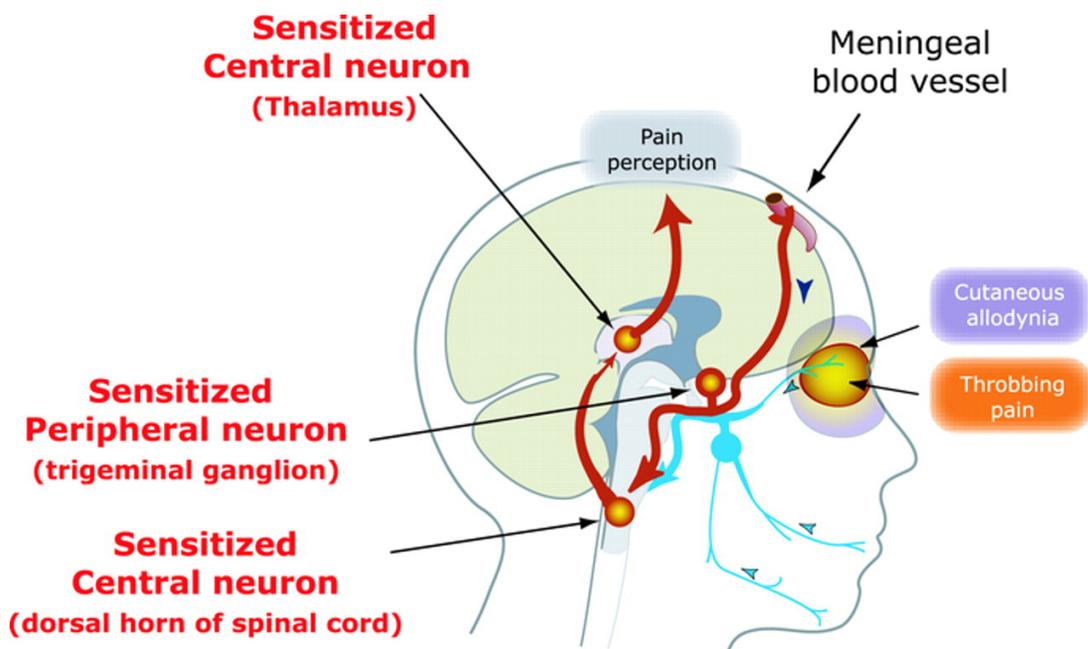


Figure 10. Sensibilisation centrale et périphérique.

La sensibilisation périphérique des neurones trijumeau-vasculaires dans le ganglion trijumeau qui sont responsables de la douleur pulsatile. La sensibilisation centrale des neurones trijumeau-vasculaires dans la corne dorsale de la moelle épinière qui sont responsables de l'allodynie cutanée. (Source : © Strassman et al., 1996) (118)

c) Facteur temps

L'aspect temporel de la sensibilisation périphérique et centrale, lors d'un épisode de migraine, est primordial. En effet, les nocicepteurs méningiaux deviennent sensibilisés seulement après quelques minutes après leur activation initiale, résultant en un mal de tête pulsatile. Le flot continu d'influx nerveux, envoyé par les nocicepteurs méningiaux sensibilisés, stimule graduellement la création de la sensibilisation centrale chez les neurones spinaux trijumeau-vasculaires, causant l'apparition de l'allodynie cutanée dans la même région que la douleur crâniale référée (113). Éventuellement, les neurones centraux trijumeau-vasculaires changent leurs propriétés physiologiques et restent sensibilisés sans se soucier dorénavant des influx des nocicepteurs méningiaux (122). La douleur devient donc une entité indépendante qui s'alimente par son propre cercle vicieux de sensibilisation. Par conséquent, les chances de succès de soulager le patient de sa migraine dépendent en grande partie du moment précis de l'intervention pharmacologique, en d'autres mots s'il a ou non déjà développé de l'allodynie cutanée au moment du traitement (123).

3. *Évaluation de la douleur*

L'évaluation de la douleur est particulièrement difficile à mettre en pratique autant dans le domaine vétérinaire qu'en médecine humaine avec les jeunes enfants ou les personnes débilitées, dû à notre incapacité à reconnaître cette douleur chez les patients (124). Par contre, cette évaluation doit être faite régulièrement pour s'assurer de l'efficacité des analgésiques ainsi que l'adaptation de leur posologie aux besoins des patients selon leur situation (103). La gestion de la douleur nécessite donc l'utilisation d'un outil pour mesurer cette dernière, mais puisque celle-ci est une perception, une mesure directe par un instrument médical est presque

impossible (125). Pour interpréter les signes de douleur chez les animaux, il faut se fier à des observations indirectes des comportements et de certains signes cliniques. Ainsi, tous changements physiologiques et comportementaux devront être notés avec diligence. De là vient toute l'importance de bien connaître les comportements normaux de l'espèce que l'on traite et d'être capable de déceler facilement ceux qui sont anormaux. Cet outil doit donc être standardisé pour aider à mesurer la douleur le plus fidèlement possible entre observateurs. Il doit être facile d'utilisation, aisé à comprendre et avoir la capacité d'évaluer les effets des traitements (125). Une des failles de l'évaluation de la douleur chez les rongeurs dans le domaine expérimental est une tendance à mesurer seulement la réponse de retrait aux stimuli thermiques et mécaniques, au lieu d'inclure la douleur spontanée (126). Plusieurs méthodes se sont donc penchées pour résoudre le problème de l'évaluation de cette douleur spontanée chez les rats.

a) Cris à haute fréquence

Les rats produisent deux types de vocalisation : des cris audibles à basse fréquence (moins de 20 kHz) et des cris ultrasons à hautes fréquences (plus de 20 kHz) (127). Ces dernières sont le sujet de plusieurs études dans le domaine de l'évaluation de la douleur. En effet, les vocalisations entre environ 20-40 kHz sont émises lors de diverses situations ou états affectifs négatifs (128). Ces cris à haute fréquence sont souvent enregistrés lors de contextes désagréables particuliers, comme la séparation de jeunes ratons de leur mère (129), une confrontation avec un prédateur, lors de soubresauts, le sevrage d'une drogue, une simulation stressante ou nociceptive (130, 131). C'est pourquoi la surveillance et l'enregistrement de ces cris à haute fréquence sont des moyens potentiels pour détecter la composante affective négative de la douleur (128). Cependant cette méthode n'est pas très spécifique, et

l'interprétation des fréquences n'est pas toujours la même selon les différents experts. L'expérience de l'évaluateur semble aussi un facteur déterminant dans l'analyse des données sonores.

b) Codification de l'expression faciale chez les rongeurs

Selon la théorie de Darwin sur l'expression des émotions chez les humains et les animaux, les expressions faciales sont conservées à travers l'évolution des espèces, donc les animaux partageraient les mêmes expressions faciales que les humains selon leur état émotionnel (132). Une échelle de grimaces des souris (*Mouse Grimace Scale*) a été développée à partir du même principe que l'échelle utilisée pour les enfants et les personnes non verbales (133). Selon les experts d'expressions faciales de douleur humaine, six caractéristiques peuvent être perçues : le resserrement orbital, le renflement du nez, le renflement des joues, la position des oreilles, les changements des moustaches et la piloérection (134, 135). Langford *et al.* (135) ont décrit et testé cette échelle semiquantitative qui a fait ses preuves chez la souris; une valeur soit de 0 (pas présent), de 1 (modérément visible) ou de 2 (sévère) est assignée par les évaluateurs pour chaque caractéristique afin de déterminer un score global de douleur pour chaque animal.

Cette échelle a ensuite été appliquée aux rats, pour faciliter les travaux de recherche puisqu'ils sont souvent les sujets de laboratoire dans les études précliniques sur la douleur (136). Une différence notable a été observée entre les deux espèces de rongeurs, les souris ayant le nez et les joues plus lisses de base que les rats, leur renflement est un signe distinctif de douleur (135, 136). L'échelle de grimace a donc été modifiée pour s'adapter aux caractéristiques du rat : le resserrement orbital, l'aplatissement du nez et des joues, les changements des oreilles et les changements des moustaches (136). Cette nouvelle échelle

(*Rat Grimace Scale*) a prouvé sa fiabilité, sa précision et sa capacité à quantifier la progression de la douleur spontanée chez le rat, à partir de quelques minutes jusqu'à une journée, donc elle s'est avérée une échelle fiable pour les douleurs aiguës. D'ailleurs un logiciel de reconnaissance faciale, *Software Rodent Face Finder*[®], a été développé durant la même période pour aider les évaluateurs à obtenir rapidement et facilement des photos présentant une bonne vue afin d'évaluer les caractéristiques faciales des rats (136).

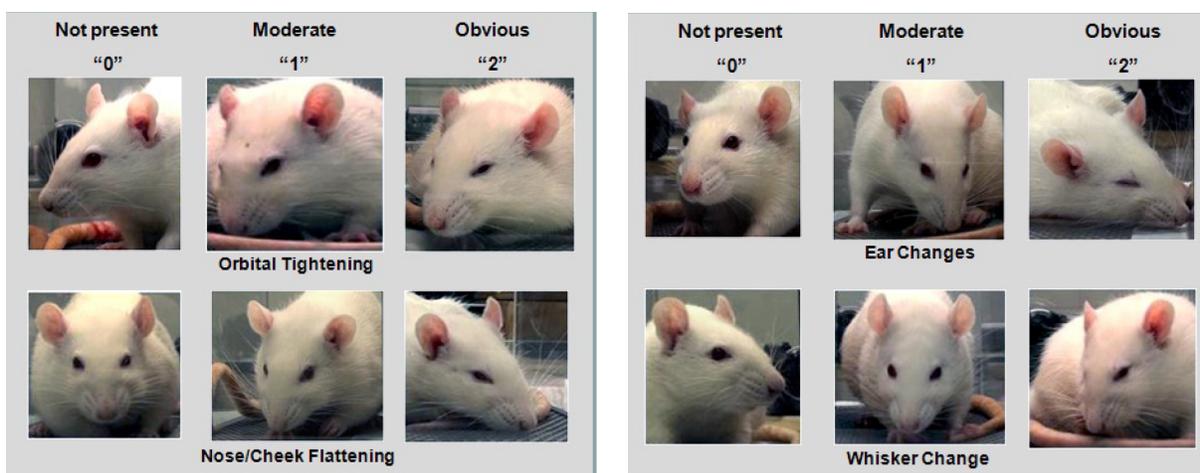


Figure 11. *Échelle de grimace du rat.*

Les expressions faciales notées de 0 à 2 comprennent le resserrement orbital, le renflement du nez et des joues, la position des oreilles, les changements des moustaches.

(Figure modifiée : © Sotocinal et al., 2011) (136)

L'échelle de grimace des rongeurs a été testée pour voir si elle pouvait être un outil fiable dans le contexte de l'évaluation de l'efficacité des analgésiques (124, 137). En effet, la mesure de la douleur spontanée peut être utilisée pour produire un score d'intervention pour les analgésiques (137). Il a été démontré par l'utilisation de l'échelle de grimace que la douleur postopératoire chez les souris dure en moyenne 36 à 48 heures et semble être

exacerbée au début de la photopériode nocturne, au moment où les rongeurs sont le plus actifs (124). Les scores obtenus grâce à l'échelle de grimaces du rat lors de l'évaluation de l'efficacité des analgésiques ont démontré qu'elle avait une bonne fiabilité autant pour distinguer des différences entre les animaux que la variabilité de la douleur chez un même animal. Elle est donc un outil utile qui a le potentiel d'orienter les interventions analgésiques dans un contexte de recherche (136, 137). Plusieurs analgésiques ont d'ailleurs été testés avec succès avec l'échelle de grimace, dont la buprénorphine, le kétoprofène, le carprofène, l'acétaminophène chez la souris (124), ainsi que la buprénorphine sous-cutanée et sous forme de gel oral et le méloxicam sous-cutané chez le rat (137).

F. TRAITEMENT

Le traitement du trauma crânien, souvent associé à des hémorragies cérébrales, est un concept aussi vague que complexe. Puisque c'est une atteinte qui peut produire des dommages dans plusieurs localisations du cerveau, le traitement doit souvent se faire sur plusieurs fronts pour obtenir des résultats positifs, malgré les multiples incertitudes. Le traitement devrait minimiser l'apparition et les répercussions des lésions crâniennes secondaires (20), puisque ce sont ces atteintes qui font le plus de dommages à long terme. De plus, compte tenu du manque de données cliniques autant prospectives que rétrospectives dans le domaine vétérinaire pour le trauma crânien, les recommandations se basent sur celles de la médecine humaine, des études expérimentales et de l'expérience personnelle des cliniciens (20). Il est donc suggéré d'appliquer un traitement agressif et immédiat pour maximiser les chances de survie de l'animal et espérer une récupération fonctionnelle et acceptable pour le propriétaire (20).

Parmi les divers aspects du traitement du trauma crânien, seuls certains seront abordés ici, car ils sont plus pertinents à notre expérimentation.

1. Oxygénation

Une bonne oxygénation est un aspect primordial du traitement du trauma crânien, puisque le manque d'oxygène au cerveau est le principal responsable de lésions crâniennes secondaires (25). Des études du trauma crânien ont démontré que la mortalité doublait chez les patients humains qui avaient des épisodes connus d'hypoxie (25). Pour les patients vétérinaires, l'oxygène peut être administré aux animaux conscients soit par un masque facial, une canule nasale ou encore un cathéter à oxygène transtrachéal. L'utilisation d'une cage à oxygène est recommandée et très souvent utilisée en médecine vétérinaire, cependant son efficacité est mitigée puisque ce genre de patients a besoin d'une surveillance et de soins fréquents, ce qui ne permet généralement pas de garder la porte close pour obtenir un environnement à haute teneur en oxygène (7).

2. Diminuer la pression intracrânienne

La pression intracrânienne est un paramètre très important à contrôler. En médecine humaine, il est possible de placer une sonde intracrânienne afin de mesurer cette pression. Pour minimiser les dommages au parenchyme cérébral, la diminution de la pression intracrânienne est un des objectifs primaires du traitement du trauma crânien. Cependant, bien qu'atteindre une pression optimale soit un but théorique, aucune cible spécifique n'a été établie chez les patients humains (4, 15). Bien que des agents hyperosmotiques, comme le mannitol, soient recommandés dans les cas les plus sévères (15), certaines modalités peuvent

être facilement instaurées pour minimiser l'augmentation de la pression intracrânienne chez les patients de moindre gravité. Par exemple, en gardant la tête des animaux élevée à un angle de 15-30° du sol, pour augmenter le drainage veineux sans compromettre l'oxygénation cérébrale (138). Aussi, en évitant tous éléments constrictifs au niveau du cou, comme un collier ou un cathéter jugulaire, qui pourraient obstruer les veines jugulaires et ainsi augmenter la pression intracrânienne (8).

3. Contrôle de la glycémie

Lors de trauma, l'hyperglycémie est due à la réponse sympathico-adrénergique (20, 139, 140). En médecine humaine, l'hyperglycémie lors de trauma crânien est associée à un taux de mortalité plus élevé et des séquelles neurologiques plus graves (141). De plus, une étude sur l'hyperglycémie chez des chiens et des chats souffrant de trauma crânien suggère que le degré d'hyperglycémie est concordant avec la sévérité de la condition (140). Chez l'humain, un débat a lieu afin de déterminer si l'hyperglycémie est une réflexion des dommages au cerveau ou plutôt une des causes de l'aggravation des lésions crâniennes secondaires (20). Ce qui est certain, c'est qu'un contrôle lâche de la glycémie est associé avec une mauvaise récupération neurologique. Cependant, un contrôle très serré du glucose chez les patients humains n'a apporté aucun bénéfice notable (142). D'ailleurs, aucune amélioration sur le taux de mortalité n'a été notée avec une thérapie intensive à l'insuline, mais plutôt une tendance à l'hypoglycémie (143). En médecine vétérinaire, il n'y a eu aucune investigation sur le contrôle du glucose sanguin par une insulinothérapie lors de trauma crânien (140).

4. Hypothermie

L'induction d'hypothermie artificielle est une des stratégies employées pour le traitement du trauma crânien en médecine humaine (144), et même récemment avec des patients canins (145). Cependant, le mécanisme par lequel l'hypothermie limiterait les lésions secondaires n'est pas encore bien défini (20). En ce moment, l'hypothèse serait que l'hypothermie réduit la relâche de neurotransmetteurs excitateurs tels que le glutamate (144). Dans une étude clinique humaine, le traitement à l'aide d'une hypothermie modérée (32-34°C), suite à un trauma crânien sévère, a démontré une amélioration dans le temps alloué aux traitements, ainsi que pour la récupération neurologique (144). Il est donc suggéré d'envisager l'hypothermie artificielle comme option de traitement pour les patients qui ne sont pas éligibles pour une intervention chirurgicale, même si la preuve de ses bienfaits n'est pas clairement démontrée (144). Cependant, il existe des désavantages potentiels à l'induction d'une hypothermie artificielle, tels que des problèmes de coagulation, incluant des dysfonctions réversibles et séquestration des plaquettes, ainsi que l'augmentation du temps de prothrombine (PT), du temps de thrombine (TT) et même du temps de thromboplastine partielle (PTT), mais aussi une prédisposition aux infections, de l'hypotension, une bradycardie et des arythmies. Ces complications surviennent généralement lors d'hypothermie sévère en deçà de 30°C (10, 146, 147).

5. Analgésie

Les analgésiques ont été largement étudiés chez les patients non neurologiques des soins intensifs hospitaliers, mais beaucoup moins fréquemment chez ceux atteints de traumas crâniens (15). En médecine humaine, il n'y a aucune donnée qui supporte les avantages du

choix d'un analgésique ou d'un sédatif pour les soins neurologiques reliés à des traumatismes crâniens importants (148). Il y a peu de données qui soutiennent le choix d'un analgésique spécifique ou même d'un protocole d'algologie (15). Lorsque l'analgésie est indiquée, les médecins utilisent le plus fréquemment des médicaments de la famille des opioïdes, que ce soit du fentanyl seul ou en combinaison avec du midazolam, du remifentanyl ou du sufentanyl seul ou en thérapie complémentaire. La morphine aussi est utilisée par plusieurs hôpitaux pour les cas de trauma crânien. La kétamine, quant à elle, est parfois utilisée seule ou avec du midazolam. Tandis que la dexmedetomidine n'est plus utilisée puisqu'il était difficile d'atteindre l'effet analgésique désiré (148). En fait, considérant la rareté des données disponibles, il est recommandé d'utiliser seulement des analgésiques s'il y a clairement de la douleur, de l'anxiété ou agitation qui pourraient augmenter la pression intracrânienne du patient. Une sédation devrait donc être établie à sa plus faible intensité et son application devrait être la plus courte possible. Toute analgésie ou sédation excessive ou non nécessaire devraient être évitées (15). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ont des propriétés anticoagulantes, sauf pour le paracétamol, qui ne permettent pas leur utilisation lors d'hémorragies intracérébrales (149). Le paracétamol quant à lui n'offre pas une analgésie suffisante (20-30% plus faible que les autres AINS) pour justifier son utilisation (149).

a) Opioïdes

En médecine vétérinaire, puisqu'il est plus difficile de reconnaître un état de douleur ou d'anxiété chez l'animal, il est préconisé d'utiliser une analgésie adéquate pour prévenir l'augmentation de la pression crânienne. Les opioïdes sont souvent les analgésiques de choix pour les patients critiques, puisqu'ils ont peu d'effets cardiovasculaires adverses, et qu'ils sont facilement réversibles grâce au naloxone. Cependant, les effets secondaires des opioïdes sont

l'hypercapnie et la dépression respiratoire qui peuvent avoir de graves conséquences lors de pression intracrânienne élevée (150, 151). C'est pourquoi, les opioïdes agonistes/antagonistes (butorphanol) et les agonistes partiels (buprénorphine) sont souvent considérés comme plus sécuritaires, puisqu'ils causent moins de dépression cardiovasculaire et respiratoire (151). L'efficacité antinociceptive du butorphanol étant moindre, il est plus utilisé comme sédatif. Les analgésiques qui sont émétiques, comme la morphine ou l'hydromorphone, sont à éviter, car la nausée et les vomissements pourraient augmenter la pression intracrânienne.

b) Mécanismes des opioïdes

Les opioïdes font partie d'une classe d'analgésiques caractérisés par leur mécanisme d'action centrale, qui est actif même en absence de lésion, contrairement aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (152, 153). Ils sont déjà largement utilisés autant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire pour traiter tout type de douleur intense, particulièrement pendant la période périopératoire (152). L'effet antinociceptif procuré par les opioïdes agonistes purs est intense, constant et dose dépendante. La principale différence entre les différents analgésiques de cette classe est leur puissance d'action, la dose « équivalente » est toujours calculée par rapport à la morphine qui est l'étalon de mesure, puisqu'elle est la première à avoir été découverte. La réponse des centres respiratoires bulbaires aux stimuli hypoxémiques et hypercapniques est diminuée selon la dose, ce phénomène apparaît dès les faibles doses d'opioïdes et interfère avec la sensibilité de ces centres nerveux sensibles au CO₂ (153). Par contre, il n'y a aucune donnée dans la littérature scientifique qui suggère que ce mécanisme pourrait avoir un impact dans un contexte d'hypoxie cérébrale. Un autre phénomène qui pourrait avoir des répercussions dans un cas de trauma crânien est l'hypotension classique lors d'administration intraveineuse rapide de morphine, celle-ci est

causée par un largage massif d'histamine qui provoque une vasodilatation artériolaire et veineuse. Il faut donc bloquer les récepteurs H1 et H2 pour antagoniser l'effet hypotenseur. Ce phénomène est causé seulement par les opioïdes libérateurs d'histamine tels que la morphine, contrairement aux agonistes partiels qui ne produisent pas de tels effets, comme le fentanyl (153). Les analgésiques recommandés dans les protocoles analgésiques vétérinaires lors de trauma crânien, sont la buprénorphine (0,01-0,015 mg/kg IM, IV q6-8h) et le fentanyl (1-2 µg/kg IV en bolus, suivi par 2-5 µg/kg/h IV en perfusion continue) (154).

c) Buprénorphine

La buprénorphine est un dérivé semi-synthétique de la thébaïne, c'est un agoniste partiel des récepteurs μ et un antagoniste des récepteurs κ , il est aussi un analgésique puissant de longue durée, c'est pourquoi il est fréquemment utilisé en clinique. Il est à noter qu'à dose équivalente, il peut causer la même dépression respiratoire que la morphine, un fait important à retenir puisqu'il n'est pas réversible par la naloxone (153).

d) Fentanyl

Le fentanyl est un agoniste pur, il peut se fixer sur tous les récepteurs morphiniques (μ , κ et δ), mais son mécanisme d'action antinociceptif est principalement lié aux récepteurs μ dont il est un puissant agoniste (100 fois plus que la morphine) (152, 153). Tout comme les autres opioïdes, ses effets analgésiques sont dépendants de la dose et elle devra donc être ajustée au besoin, cependant il faut noter que ses effets secondaires sont aussi dose-dépendante. Sa voie d'administration préférentielle est intraveineuse. Le fentanyl peut aussi être administré par voie sous-cutanée, transdermique (timbre) ou intramusculaire; toutes ces voies sont efficaces, mais elles mettront plus de temps à atteindre leurs effets maximaux (152).

Le fentanyl fait partie de la famille des dérivés de la phénylpipéridine, comprenant aussi l'alfentanil et le remifentanil qui ont des demi-vies très courtes (153). Le fentanyl, tout comme ses homologues, est un analgésique très puissant qui a une action de courte durée (30 minutes) et qui a aussi comme caractéristique d'avoir peu d'effets sur le système cardiovasculaire, ce qui en fait l'analgésique de choix périopératoire (152). Le fentanyl ne s'élimine pas par le métabolisme hépatique comme la morphine, son facteur limitant est donc le volume de distribution. Ainsi sa longue demi-vie d'élimination est causée par son grand volume de distribution, malgré sa clairance plasmatique élevée. Ce mécanisme peut donc provoquer son accumulation dans l'organisme dans les cas de fortes doses uniques ou cumulées ou de perfusion continue. De ce fait, le fentanyl est un opioïde de courte durée à faible dose, mais peut devenir un analgésique de très longue durée à dose élevée (153). Le fentanyl peut s'accumuler dans les muscles et par la suite produire le phénomène de recirculation lors du réchauffement de la phase de réveil et donc de la vasodilatation du compartiment musculaire. L'alfentanil a un volume de distribution beaucoup plus petit, et donc une courte demi-vie d'élimination, malgré une clairance plus faible, ainsi qu'une absence de recirculation. Il s'accumule aussi beaucoup moins dans le compartiment musculaire et termine rapidement sa distribution. Par contre, la pharmacocinétique de l'alfentanil est beaucoup plus encline à être influencée par un problème de clairance hépatique que le fentanyl (153). Le remifentanil est un analgésique de premier choix en perfusion continue lors du traitement de la douleur associée à un trauma crânien important, puisqu'il agit rapidement et s'élimine rapidement, il est donc très sécuritaire. Le fentanyl aussi un bon choix pour traiter la douleur, particulièrement lorsque la perfusion continue n'est pas disponible puisque à haute dose il s'accumule dans l'organisme et se relâche sur un plus longue période de temps (153).

HYPOTHÈSE ET OBJECTIF DE RECHERCHE

Notre hypothèse de départ est que le fentanyl devrait soulager les animaux souffrant d'hémorragie intracérébrale, sans causer de changements significatifs ni au niveau tissulaire du cerveau ni au niveau de la motricité (examen neurologique & moteur), ce qui permettrait de l'utiliser afin de maximiser le bien-être et la récupération de ces animaux en période post-traumatique. Ceci permettrait aussi l'utilisation des opioïdes dans les modèles d'hémorragie cérébrale en recherche.

Présentement il n'y a aucun article sur l'efficacité des opioïdes dans le traitement de la douleur associée à l'hémorragie intracérébrale due au trauma crânien. Nos objectifs de recherches sont donc de tester trois différentes doses d'un analgésique de la famille des opioïdes, le fentanyl, et d'évaluer les modifications histopathologiques et comportementales (douleur & motricité) lors d'une hémorragie intracérébrale chez le rat. Ceci dans le but d'obtenir des indications plus précises lors du traitement des patients de trauma crânien.

Journal of Pain Research, 2016, 9:1039

DOI: [10.2147/JPR.S121415](https://doi.org/10.2147/JPR.S121415)

**EFFECTS OF FENTANYL ON PAIN AND MOTOR
BEHAVIORS FOLLOWING A COLLAGENASE-
INDUCED INTRACEREBRAL HEMORRHAGE
IN RATS**

Laurence Saine¹, Pierre Hélie², and Pascal Vachon¹

Faculty of Veterinary Medicine, Departments of Veterinary Biomedicine¹ and
Pathology & Microbiology², University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada

ABSTRACT

Purpose: Intracerebral hemorrhage (IH) and cephalalgia are common consequences of traumatic brain injury. One of the primary obstacles for patient recovery is the paucity of treatments to support an appropriate analgesic protocol. The present study aims to assess pain and motor behaviors following different doses of fentanyl on a rat model of IH.

Methods: Twenty-one male Sprague-Dawley rats underwent a stereotaxic surgery to produce a collagenase-induced IH in the right caudoputamen nucleus. The control group (n=6) received saline subcutaneously (SC), and experimental groups received either 5 (n=6), 10 (n=6), or 20 (n=3) $\mu\text{g}/\text{kg}$ of fentanyl SC, 2h following surgery and on the 2 subsequent days. Only 3 animals received 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ because this dose caused catalepsy for 15-20 min following the injection. The rat grimace scale, a neurological examination, balance beam test and rotarod test were performed for 5 consecutive days postoperatively to evaluate pain and motor performance. At the end of the experimentation, the brains were evaluated to determine hematoma volume, the number of reactive astrocytes and necrotic neurons.

Results: When compared to controls, the grimace scale showed that 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fentanyl significantly alleviated pain on day 2 only ($p<0.01$) and that 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ alleviated pain on days 1 ($p<0.01$), 2 ($p<0.001$), and 3 ($p<0.01$). For the rotarod test, only the 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ group showed significant decreases in performance on days 5 ($p<0.05$) and 6 ($p<0.02$). The neurologic exam was not significantly different between groups, but only the hopping test showed a poor recuperation for the 5 and 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fentanyl group when compared to saline ($p<0.01$). No differences were found between groups for the balance beam test, the histopathological results.

Conclusions: Fentanyl, at a dose of 10 µg/kg SC, provides substantial analgesia following a collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats, however it can alter motor performance following analgesic treatments.

Key words: analgesia, brain trauma, cephalalgia, grimace scale, histopathology, neurological exam

Introduction

Traumatic brain injury (TBI) is one of the major causes of invalidity and death in our society. Neurologic dysfunctions following brain injuries are often minimal immediately following the impact but a progressive deterioration occurs with time.^{1,2} Intracerebral hemorrhage (IH) is the most common and predominant consequence of TBI. The primary obstacle for patient recovery is the paucity of efficient treatments and the lack of publications to support treatment option.^{3,4} Traumatic IH is a multi-faceted condition which has a complex physiopathology. Mechanisms involved include neuroinflammation, breakdown of the brain-blood barrier (BBB) and an increased intracranial pressure. One non-negligible aspect is the pain associated with TBI and the risk of central pain sensitization, chronic headaches and low recovery rate if the pain is not treated.⁵⁻⁷ In human patients, a precautionary principle prevails regarding analgesic medication for TBI patients, as practitioners fear greater cognitive and motor deficits with analgesia in the setting of BBB breakdown. However, this precautionary pain intervention protocol is based only on clinical experience.² On the other hand, veterinarians are less prone to avoid analgesics to relieve their TBI patients, possibly because

cognitive functions and headaches are more difficult to evaluate in animals.⁸ Also, the owners are less demanding regarding memory and fine motor control of their pets. In both cases, there is no evidence to support the benefit, or lack thereof, of analgesics or sedatives for neurologic care of TBI.⁹ Furthermore, there is only scarce data available pertaining to the choice of a specific analgesic for the treatment of TBI, as well as appropriate pain treatment protocols.¹⁰ If it could be shown that certain analgesics are not deleterious to the brain in a TBI situation, great benefits could be provided for patients. However, if the opposite is demonstrated, this would confirm current practice in human medicine and influence the veterinarian's intervention protocol for TBI.

The current study aims to assess pain and motor behaviours following different doses of fentanyl in a rat model of IH, and to evaluate the associated histopathology. Fentanyl was chosen for this study, because as with morphine, it is the most widely used analgesic to relieve pain associated with TBI.¹¹ Also, fentanyl is very efficient to relieve intense pain, and unlike morphine, it does not provoke histamine release, contributing to hemodynamic effects that may not be desirable in this pathology.¹² Furthermore, it acts rapidly, has a shorter half-life than most opioids and can be reversed by a μ -receptor antagonist (i.e. naloxone), making it safer to use than other analgesics.^{12,13} The recommended subcutaneous (SC) dose of fentanyl for rats is between 40-160 $\mu\text{g}/\text{kg}$. With this posology the analgesic effects are seen for 2 hrs.^{14,15} Fentanyl was selected since it was shown to be the most effective pain-relieving drug in rats.¹⁴ The optimal goal would be to maximize fentanyl use to obtain a better treatment protocol for TBI patients, which would relieve pain without causing any motor or cognitive deficits. In this study we did not address possible cognitive changes with analgesic treatment.

Materials & methods

Animals

Twenty-four specific pathogen-free male Sprague-Dawley rats (Charles River, St-Constant, Qc, Canada), weighing between 300 and 380g, at the beginning of the study, were used for this study. Animals were randomly assigned to experimental groups. They were kept in a standard laboratory animal environment (filtered air: 15 changes/h, humidity: 40-60%, temperature: 21 ± 3 °C and light-dark cycle: 12:12 h). Rats were pair-housed in polycarbonate cages (Ancare, Bellmore, NY, USA) with hardwood bedding (Beta chip, North-eastern Products Co., Warrenburg, NY, USA). Animals were acclimated for 7 days prior to the beginning of the study. A polyvinyl chloride (PVC) tube was placed in each cage for environmental enrichment. Rats were given tap water and laboratory rat diet *ad libitum* (Charles River Rodent Chow 5075, St-Constant, QC, Canada). The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee prior to animal use, and it is compliant with the Canadian Council on Animal Care guidelines (1993).

Surgical procedures and collagenase injection

To induce a standardized IH, animals were anaesthetized with vaporized isoflurane (3% induction, 2% maintenance; Aerrane, Baxter, Mississauga, ON, Canada) in oxygen (0.5L/min). After hair clipping and disinfection of the cranial skin with proviodine, rats were placed in a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) in aseptic conditions, before undergoing surgery. A 2 cm sagittal incision was performed on the skin and periosteal membrane. After exposing the cranial bone, a burr hole measuring 1.5 mm in

diameter was drilled at stereotaxic coordinates with reference to bregma (antero-posterior 0.0 mm and lateral 3.0 mm) to attain the caudoputamen nucleus. Using a 5 μ L Hamilton syringe, 2 μ L of a collagenase solution consisting of 0.4 UI Collagenase Type IV (powder in saline; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was then injected over a period of 10 min through the burr hole in the right caudoputamen nucleus, 5.0 mm below the dura. The needle was left in place for an additional 5 min to prevent backflow. The needle was then removed and the skin was sutured with five simple interrupted stitches (silk 2-0). Throughout the surgery, rats were on a heating pad, their rectal temperature was monitored (Thermalert TH-8, Physitemp, Clifton, NJ, USA) and maintained within 35.5 to 36.5 °C.

Treatments

The collagenase-injected animals received a subcutaneous (SC) injection 2 h following surgery and on the morning of the 2 following days. Rats in the control group (n = 6) received saline only, using a similar volume (0.2 mL) to the fentanyl high dose treated animals. Animals in each experimental groups received 5 (n = 6), 10 (n = 6), or 20 (n = 3) μ g/kg of fentanyl (Fentanyl citrate, 50 μ g/mL; Sandoz, Boucherville, Canada). Fentanyl doses were less than recommended doses (40-160 μ g/kg)^{14,15} considering the breakdown of the blood brain barrier in this animal model. Only 3 animals received the 20 μ g/kg dose since they were clearly overdosed, showing signs of catalepsy and whole body rigidity for a period of 15-20 min following the fentanyl injection. Since animals recuperated well from this dose, it was then decided to continue the study with only 3 animals in this treatment group. The observer (L.S.) tasked with the rat evaluations was blinded to all treatments.

Three animals formed a sham group, where the same surgical procedures were performed as for the collagenase-injected animals, except that saline was injected intracerebrally, and they were treated with 10 µg/kg of fentanyl SC for three consecutive days and evaluated on behavioral tests.

Behavioral evaluations

A week prior to the surgery, all rats were accustomed to the neurological and motor tests for 5 days. Experimental groups were then formed and over the last 2 days, baseline scores were recorded. Figure 1 shows the study protocol timeline. The rat grimace scale, evaluated with videos, was used to evaluate pain behavior. Each rat was filmed prior to and following the SC injection on the day of the surgery (day 1) and on 2 subsequent days (days 2 and 3). Motor behavioral tests were then performed in the following order: the neurological exam, the balance beam test and the rotarod test. They were done on 5 subsequent days starting 24 h following the surgery (days 2-6). All behavioral tests were performed and evaluated by an observer (L.S.) blinded to the treatments.

RGS & Pain Evaluation

In this study, rats were exposed to pain cause by the IH lesion. The brain parenchyma itself does not have pain receptors, but the nervous fibers surrounding the blood vessels and the afferent pathways will be sensitive to the neuroinflammation, high intracranial pressure and ischemia.⁸ To evaluate this pain, rats were filmed for a 2 minutes duration sequence for each take (Logitech Webcam C210, Logitech, Newark, CA, USA) in a quiet, dimmed light room, before treatments and on 3 occasions, at 15 min intervals, starting 1 h after the treatment (days 1, 2 and 3). Videos were also taken on days 4 and 5 (days without treatment). Videos

were analysed following the Sotocinal's Rat Grimace Scale (RGS) method, described in details in their manual.¹⁶ This scoring has shown a very good inter-observer and intra-observer reliability (with respectively 0.85 [0.78 – 0.90 95% CI] & 0.83 [0.76 – 0.89]) in other studies.¹⁷ The mean of the data collected from the 3 videos following treatments was used for analysis. Scoring included four action units: orbital tightening (narrowing of the orbital area, displaying a partial or complete eye closure or eye “squeezing”), nose/cheek flattening (display of less bulging of the nose and cheek, with possibly the absence of the crease between the cheek and whisker pads), ear changes (ears are folded, curled and angled forwards or outwards, resulting in a pointed shape. The space between the ears can look wider) and whisker changes (pointed forward, far from the face and may bunch up). Each of the action units were given an intensity rating (0: absent; 1: moderate or equivocation over its presence or absence; 2: pronounced action units), then an RGS score was calculated by averaging all intensity ratings for each video.¹⁶ The maximal score reported is the mean of the action units (maximal value = 2). All videos were evaluated on the entire sequence of each takes by an observer (L.S) who was blind to treatment groups.

Neurologic Exam

The neurologic exam was composed of semi-quantitative tests taken from previous published studies¹⁸⁻²¹ from our lab. Animals were evaluated following the surgery for 5 consecutive days starting 24 h after the surgery. The value reported is the sum of all tests (maximum score of 24) which consisted of the following:

- *activity*: exploration of the immediate environment when the rat is placed on a novel hard surface (0: no exploration; 1: exploration with head movements only; 2: exploration of the

immediate environment; 3: normal exploration);

- *locomotion*: the rat is placed on a hard surface and forward progression is observed (0: no displacement; 1: unilateral rotation only; 2: incomplete body movements on both sides, forward progression mainly by rotation; 3: normal linear progression);
- *visual positioning*: the rat is held by the tail above a contact surface then moved toward a hard surface and the visual positioning of both limbs is evaluated (1: contact with one limb only, other limb held in a flexed position; 2: partial flexion of the affected limb; 3: both limbs extended to make contact and normal walking movements);
- *tremor*: animal is held by the tail in an elevated position so that the front paws remain in contact with a hard surface, stability of hind paws is observed (1: tremor; 2: no tremor);
- *pelvic limbs hypertonicity*: animal is held by the tail in an elevated position so that the front paws remain in contact with a hard surface, rigidity of hind limbs is observed as a hyperextension of the hind legs (1: hypertonicity; 2: normal tonicity);
- *tail rigidity*: the tail is elevated at mid-length and rigidity is observed (1: no flexibility observed, if placed in a curved position remains as such; 2: moderate rigidity; 3: normal flexibility and movements);
- *climbing*: climbing on a wire grid to observe skill and symmetry of forelimbs (1: holds wire but cannot let go; 2: tries to climb but has difficulty doing so, little forward movement with important asymmetry; 3: climbs but the movement is moderately asymmetrical; 4: normal climbing, symmetrical movements of both forearms are observed);
- *positional passivity*: during hand restraint, the affected posterior limb (left) is pulled away from the animal and the motor response is observed (0: no flexion of the limb; 1: flexion

movements on occasions; 2: normal flexion upon each extension);

- *hopping*: the rat is held by hind legs and one forepaw so that the entire weight of the animal is supported by one limb. The animal is moved laterally and hopping movements are evaluated to assess postural adjustments (0: no postural adjustment; 1: delay of the initiation of movement to adjust posture of the affected limb (left) 2: normal postural adjustment).

Balance Beam Test

A custom-made balance beam (wooden rod of 80 cm in length and 2.8 cm diameter) was placed over an open table (20 cm distance) with a PCV pipe (10 cm diameter) at the end (as an incentive to move forward) was used to evaluate the motor coordination and balance of the rat crossing the beam without falling. The fastest time of a maximal of 3 consecutive trials was recorded. If the rat was unable to move forward, its ability to stay balanced on the beam was noted. This test was performed following the neurological exam.

Rotarod Treadmill

A rotarod treadmill (ENV576, Med Associates, St Albans, VT) was used to test the motor coordination of the rats prior surgery and in the recuperation post-surgical phase. The rotarod was set to accelerate over a 5 min period from 2.5 to 25 rpm, the maximal time performance of each rat was recorded (maximum: 5 min). The value reported for each animal is the percentage of the baseline values. This test was performed following the balance beam test.

Perfusion, Histological Procedures, Immunohistochemistry & Image Analysis

After the last neurologic examination (day 6), rats were anesthetised with an intraperitoneal injection of 200 mg/kg of ketamine (Ketalean, Bimeda-MT, Cambridge, ON, Canada) and 5 mg/kg of xylazine (Xylamax, Bimeda-MTC, Cambridge, ON, Canada) and then perfused using the following method. The abdominal skin and muscles were cut and a pair of forceps was used to clamp the descending aorta. The thoracic cavity was then exposed, the right atrium was cut and the rats were perfused through the heart (right ventricle) with a physiological dextrose-sucrose solution (100 mL per rat; solution composition for 1L: 8 g NaCl, 4 g dextrose, 8 g sucrose, 0.23 g calcium chloride).¹⁹⁻²¹ All perfusion products were purchased from Sigma Inc. (St-Louis, MO, USA). A second perfusion immediately followed using a 10% neutral-buffered formalin solution (100 mL per rat). Brains were removed whole and fixed in the formalin solution for 48 h and then embedded in paraffin for slide preparation. Five μm -thick sections (one every 200 μm from the beginning of the hematoma) were stained with hematoxylin, eosin, phloxine and saffron (HEPS). Each brain section was photomicrographed using an AxioImager M1 microscope (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Germany) and the area occupied by the hematoma was determined using Zen 2012 blue edition software (Carl Zeiss Microscopy GmbH). Then the hematoma volume was estimated by multiplying the hematoma area of each section by the distances separating two consecutive sections (200 μm). Three sections (sections adjacent to the 2nd, 3rd and 4th HEPS-stained section) were stained with Fluoro-Jade® B, and the number of necrotic neurons was counted in the penumbral area of the hematoma (average of four areas (top, bottom, right, left) at 10X). Only cells that showed typical green fluorescence (excitation peak at 480 nm and emission peak at 525 nm) were counted. Two sections (sections adjacent to the 2nd and 4th

HEPS-stained section) were processed with immunohistochemistry for glial fibrillary acidic protein (GFAP) executed using polyclonal antibodies (immunoglobulin fraction of rabbit anti-sera diluted at 1:500 in phosphate-buffered saline (pH 7.6) with 1% bovine serum albumin) (BioGenex Laboratories, San Ramon, CA, USA) to determine the number of reactive astrocytes. Astrocytes were counted in the penumbral area of the hematoma (average of four areas (top, bottom, right, left) at 20X); all astrocytes had well-developed processes and intense GFAP immunoreactivity, consistent with reactive astrocytes.

Statistical Analysis

For for all behavioral tests an analysis of variance (ANOVA) was performed on repeated measures with the period (before vs after) as the intrasubject factor and treatment (5 µg/kg, 10 µg/kg and saline). Cochran-Mantel-Haenszel (semiquantitative data) for repeated measures was done to evaluate changes over time (5 days). For the rotarod results, a priori contrasts were performed adjusting the alpha of each comparison with the Benjamini-Hochberg sequential method (quantitative data). For the statistical analysis of histological findings, a one-way ANOVA with post hoc Tuckey tests were performed.

Results

Grimace pain score

Figure 2 shows the grimace pain score results. Treatments showed statistically significant differences on day 1 ($F_{2,15}=11.8$; $P<0.001$), day 2 ($F_{2,15}=15.5$; $P<0.001$) and day 3 ($F_{2,15}=5.2$; $P<0.02$) only. The fentanyl group 5 µg/kg (Figure 2A) showed a significant

difference with the control group on day 2 ($P < 0.01$; contrast t -test values (before and after fentanyl) = 3.04 and -3.31), before and after the injection on that day. The fentanyl group 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Figure 2B) showed a significant difference with controls, the pain was alleviated after injection on day 1 ($P < 0.01$; contrast t -test values = -3.03), before and after injections on day 2 ($P < 0.01$ and $P < 0.001$; contrast t -test values (before and after fentanyl) = -3.71 and -6.53). And on day 3, only post-fentanyl administrations relieved pain ($P < 0.01$; contrast t -test values = -3.23). No statistic was performed for the fentanyl group 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($n = 3$) (Figure 2C), however pain score are well below the fentanyl group 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and it is true on everyday. However it indicates that the 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ group seems to follow the same tendency as the 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ group. On days 4 and 5 no treatments were performed and treatment groups were not significantly different on the Grimace Pain Score from saline controls. It is important to note that the pain score is much lower on those two last days for every group.

Neurological exam and individual tests

The results the total score of the neurological exam are presented in Figure 3. All groups were severely affected following the surgery (60-65% of baseline scores on the day following the surgery) and recuperated gradually over time (up to 75-80% of their baseline score on day 6). No statistically significant difference was seen between groups ($F_{2,15} = 0.32$; $P = \text{ns}$). Figure 4A represents the results of each test for the saline group; there is a statistically significant difference for the hopping score over time ($P < 0.01$; Mean score differences = 13.2). Figure 4 also shows the hopping results for the 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Figure 4B) and 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Figure 4C) groups, which did not recuperate over time. No significant difference was

observed for the other individual neurological tests when comparing different treatments on each individual day and over time.

Balance beam test

Before surgery, all groups had comparable baseline results on the time to cross the beam (saline: 3.6 ± 1.4 , and 3.5 ± 0.8 , 3.8 ± 0.6 and 4.4 ± 1.0 sec for 5, 10 and 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fentanyl, respectively). Following surgeries, results were very comparable between groups. On day 2 all animals fell once placed on the beam. On day 3, 17% of the saline treated animals and 50-66% of the fentanyl treated animals were able to stay balanced on the beam. On day 4, 66% of animals in each group were able to stay on the beam and all animals were able to balance themselves on the beam on days 5 and 6. None of the animals were able to move forward.

Rotarod treadmill test

Rotarod results are presented in Figure 5. All groups were severely affected following the surgery (35-50% of baseline scores on the day following the surgery) and recuperated gradually over time. Treatments showed statistically significant differences ($F_{2,15} = 2.2$; $P < 0.05$). Only the 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fentanyl treatment showed significant a priori differences on days 5 ($P < 0.05$; contrast t -test values = -4.41) and day 6 ($P < 0.02$; contrast t -test values = -6.44), animals performing more poorly on these days than the control and the 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ groups. The 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fentanyl group cannot be statistically significant because of the low number of subjects in this group, but as an indicator they follow the same trend as the 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ group. The 3 animals that were sham operated showed no difference on the rotarod treadmill following 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ SC of fentanyl for 3 consecutive days. (Days 1, 2 and 3 postop (compared to base line)

= 99, 101 and 103% respectively). These animals were moving freely in their cage 15-20 min following the surgery and showed no signs of pain during the grimace pain score evaluation. Their balance beam test showed no significant differences from baseline. And their neurological exam was also normal confirming our previously published findings.¹⁹⁻²¹

Histopathological results

No statistically significant differences were found between saline and fentanyl treated animals for the hematoma volume, the number of necrotic neurons and reactive astrocytes. Mean values are nearly the same for all groups. The mean hematoma volume (\pm SD) for the saline, 5 μ g/kg, 10 μ g/kg and 20 μ g/kg fentanyl groups are respectively 11.9 ± 2.33 , 12.1 ± 1.0 , and 12.1 ± 3.19 mm³. The mean total number of astrocytes (\pm SD) for the saline, 5 μ g/kg, 10 μ g/kg and 20 μ g/kg fentanyl groups are respectively 327 ± 35.7 , 299 ± 156.2 and 284 ± 70.0 . The mean total number of necrotic neurons (\pm SD) for the saline, 5 μ g/kg, 10 μ g/kg and 20 μ g/kg fentanyl groups are respectively 16 ± 6.3 , 16 ± 8.3 and 12 ± 5.3 . The mean hematoma volume, total number of astrocytes and total number of necrotic neurons for the 20 μ g/kg fentanyl groups are respectively 12.6 ± 3.87 mm³, 304 ± 137.1 and 21 ± 9.7 .

Body weights

Only the saline control group gained weight (7%) during the week following the surgery. All the fentanyl groups did not show a significant weight gain or loss during that period.

Discussion

The study shows that 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of fentanyl given SC can provide substantial analgesia in a collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. Even if fentanyl is considered a short action drug, its effects can last between 90-120 min if injected SC in a healthy rat.¹⁵ Furthermore, it has been suggested that conditions involving inflammation can affect the pharmacokinetics of drugs by affecting drug metabolizing enzymes and their transporters. The clinical results are hard to predict, but it can include altered concentrations of the drug systemically or locally at the site of action.²² Also, inflammation in the brain, as seen in IH in animals and humans, is proven to disrupt the BBB allowing the migration of macromolecules from blood to the neuroparenchyma.^{23,24} This increased BBB permeability provides the opportunity for drugs like opioids to pass directly into the brain and accumulate, making them more effective.^{25,26} It is thus difficult to know the exact analgesic duration of fentanyl in these conditions. Group 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ showed significantly less signs of pain during all 3 days of treatments and even before its treatment on day 2, implying that fentanyl offered a substantial pain relief for a long period and prevented sensitization of the central nervous system (CNS) without changing motor behaviors.

For the motricity assessment of this study, the rotarod results clearly show a progressive improvement curve for all groups after surgery, except for the 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ group on days 5 and 6 where they performed significantly below the results of saline and 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ groups. This finding is also supported by the 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ data that leans in the same direction. Sham group results suggest that the motricity was not affected by the fentanyl (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) injection alone, implying that the deficits seen in the IH rats were caused by IH combined with fentanyl, and not solely the dazing effect of the drug. Morphine has been shown to inhibit

local production of cytokines during inflammation, and with chronic treatment to also decrease neutrophil and macrophage recruitment at the injury site.^{27,28} These findings suggest that fentanyl could reduce the damage caused by the local brain inflammation. Since the immunohistochemistry and histopathological results from our study demonstrated no significant difference between treatment groups, it is then possible to conclude that fentanyl does not improve nor worsen brain lesions in IH. Regarding lesions in other brain areas, even though we realize rupture of the blood-brain barrier likely increased the amount of fentanyl in the brain tissue, we think this increase was probably limited to the penumbra, and the doses used are not known to be neurotoxic. Furthermore, the ipsilateral cortex and contralateral neuroparenchyma did not show any evidence of neurotoxicity whether with histopathology (HEPS), Fluoro-Jade staining or GFAP immunohistochemistry.

Similarly, the study of Statler *et al.* on the effects of different anesthetics in TBI²⁹ showed that the worst results for motor and cognitive skills were associated with fentanyl and morphine. These drugs had no neuroprotective effect and it was suggested that they failed to reduce the inflammation injury cascade caused by cerebral trauma. As in our experiment, the volume of the lesion was not affected by different analgesic treatments. Therefore, the decreased performance on the last 2 days for 10 µg/kg group could be explained by a functional interference of the drug. Morphine, another opioid agonist, has been shown to hinder the restructuration of new brain synapses.³⁰ Cognitive deficits could be caused by a change of the gamma-aminobutyric acid-ergic (GABAergic) inhibition that controls neuronal excitation. Also, a loss of GABA-containing neurons is observed in the dentate gyrus of the hippocampus in morphine-exposed rats, thereby affecting the synaptic plasticity and spatial memory of the subjects.³⁰ However, there are presently no publications we know of on the

effects of fentanyl on neural plasticity. It is important to note that even with decreased motor capabilities, the 10 µg/kg group was still recuperating. It is possible that with time they could catch up with the other groups.

The total score of the neurologic exam does not show any difference between groups as they all start at 60-65% of the baseline score and recuperate around 75-80% on day 6, exhibiting a general improvement of their functions. However taken individually, the hopping test stands out. It is always weakest on the first day, but there is a significant improvement of the score for the control saline group that fails to be present on the scores of the two fentanyl groups. This tendency follows the lack of amelioration on the rotarod for the 10 and 20 µg/kg groups, indicating that the use of fentanyl with IH will affect more strongly the spatial proprioception of the subjects since it is involved in both tasks.

The balance beam did not deliver as much information as it was hoped. This test was supposed to evaluate walk progression on the beam, but instead it only showed if rats would fall off or could balance themselves on the beam. The only interesting result was that on day 2 fentanyl groups were quicker to be able to stand on the beam compared to the saline group. This observation could probably be explained by the fact that fentanyl subjects were less painful on day 2, given that starting on day 3 all groups did the same performance for the rest of the experimentation. We conclude that this test is too demanding for the IH rat model and it does not provide interesting data for this kind of study.

The 20 µg/kg group was downsized to only 3 rats, after noticing signs of catalepsy and body rigidity following the fentanyl injection. Those signs were observed for the first 15 to 20 min post-treatment, thus when the videos were taken an hour post-injection the rats had returned to normal. Those symptoms are clearly an indication of opioid overdose, despite the

suggested SC fentanyl analgesic dose for rats ranging from 40 µg/kg to 160 µg/kg.¹⁵ This phenomenon suggests what clinicians already knew that drugs affecting the CNS are more potent with BBB breakdown and their usual dose should be reduced with care.³¹

Limitations

The use of only one drug, fentanyl, is one of the limitations of this study. It would be interesting to perform further research with different analgesics that would provide a better motor and cognitive recuperation. Ketamine, an N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist with analgesic properties, could be an option since it has anti-excitotoxic and anti-apoptotic properties.³² However according to Statler *et al.*²⁹ it would be a poor choice as it had the worst hippocampal neuronal survival and it may exacerbate the hypoperfusion and/or hippocampal glucose utilisation. Diazepam could be a better alternative since it only shows a trend toward longer latency on the motor tests.²⁹ Also, it would be interesting to test the motor and cognitive effect of gabapentin in a TBI model, as it is used as an anti-neuropathic pain medication and to prevent central pain sensitization^{33,34}, but some authors have shown limited efficiency with this molecule³⁵.

Conclusions

The use of 10 µg/kg of fentanyl administered subcutaneously to relieve pain in a rats suffering of IH seems safe and efficient. However the analgesic had an effect on some motor evaluations, notably the hoping test and the rotarod treadmill. Disregarding these effects could represent an important bias in future studies. In summary, we recommend to use a dose of 10

µg/kg of fentanyl to relieve the pain associated with a TBI rat model, while taking into account of the possible deficits in the experimentation planning.

Acknowledgments

This study was supported by the Fond de Développement pour la Médecine des Animaux de Laboratoire (Pascal Vachon). We want to acknowledge Guy Beauchamp (Faculty of Veterinary Medicine University of Montreal) for statistical analyses.

Abbreviations

ANOVA: Analysis of variance ; BBB: Brain-blood barrier ; CI: Confidence interval ; CNS: Central nervous system ; GABA: Acide γ -aminobutyrique ; GFAP: glial fibrillary acidic protein ; HEPS: Hematoxylin eosin phloxine saffron ; IH: Intracerebral hemorrhage ; NaCl: Sodium Chloride ; NDMA: N-Nitrosodimethylamine ; PVC: Polyvinyl chloride ; RGS: Rat grimace scale ; SC: Subcutaneous ; TBI: Traumatic brain injury.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Lu J, Marmarou A, Choi S, Maas A, Murray G, Steyerberg EW. Mortality from traumatic brain injury. *Acta Neurochir Suppl.* 2005;95:281-285.
2. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2007;24 Suppl 1:S1-106.

3. Morgenstern LB, Hemphill JC, 3rd, Anderson C, Becker K, Broderick JP, Connolly ES, Jr. *et al.* Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2010;4:2108-2129.
4. Jauch EC, Saver JL, Adams HP, Jr., Bruno A, Connors JJ, Demaerschalk BM *et al.* Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2013;44:870-947.
5. Burstein R, Goor-Aryeh I, Jakubowski M. Sensitization of trigeminovascular neurons and migraine therapy with triptans. In: Villanueva L, Dickenson AH, Ollat H, editors. *The Pain System in Normal and Pathological States: A Primer for Clinicians. Progress in Pain Research and Management*. Seattle: IASP Press; 2004:211-222.
6. Grant D. *Pain management in small animals*. New York: Butterworth-Heinemann/Elsevier; 2006.
7. Williams E. Nursing perspective on pain management. In: Vadivelu N, Urman RD, Hines RL, editors. *Essentials of Pain Management*. New York, NY: Springer New York; 2011:367-377.
8. Gregory NG. *Physiology and behaviour of animal suffering*. Oxford, UK Ames, Iowa: Blackwell Science; 2004.
9. Teitelbaum JS, Ayoub O, Skrobik Y. A critical appraisal of sedation, analgesia and delirium in neurocritical care. *Can J Neurol Sci*. 2011;38(6):815-825.
10. Torbey MT, Bosel J, Rhoney DH, Rincon F, Staykov D, Amar AP *et al.* Evidence-Based Guidelines for the Management of Large Hemispheric Infarction : A Statement for Health Care Professionals from the Neurocritical Care Society and the German Society for Neuro-Intensive Care and Emergency Medicine. *Neurocrit Care*. 2015; 22(1): 146-164..

11. Shapiro BA, Warren J, Egol AB, Greenbaum DM, Jacobi J, Nasraway SA *et al.* Practice parameters for intravenous analgesia and sedation for adult patients in the intensive care unit: an executive summary. Society of Critical Care Medicine. *Crit Care Med.* 1995;23(9):1596-1600.
12. Chauvin M, Beaulieu P. Pharmacologie des opioïdes. In: Beaulieu P, editor. *Pharmacologie de la douleur.* Montréal, QC, CAN: Les Presses de l'Université de Montréal; 2005:39-77.
13. Deschamps J-Y. *Vade-mecum de gestion de la douleur chez le chien et le chat.* Gestion de la douleur chez le chien et le chat. Paris: Med'com; 2010.
14. Meert TF, Vermeirsch HA. A preclinical comparison between different opioids: antinociceptive versus adverse effects. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005;80(2):309-326.
15. van den Hoogen RH, Colpaert FC. Epidural and subcutaneous morphine, meperidine (pethidine), fentanyl and sufentanil in the rat: analgesia and other in vivo pharmacologic effects. *Anesthesiology.* 1987;66(2):186-194.
16. Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS *et al.* The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain.* 2011;7:55.
17. Oliver V, De Rantere D, Ritchie R, Chisholm J, Hecker KG, Pang DS. Psychometric assessment of the Rat Grimace Scale and development of an analgesic intervention score. *PLoS One.* 2014;9(5):e97882. doi:10.1371/journal.pone.0097882.
18. Vachon P, Ste-Marie L, Montgomery J. Predictive value of a battery of behavioural tests to determine the extent of induced cerebral ischemia by cauterisation of the middle cerebral artery. *Sci Tech Anim Lab.* 1999;24(3):171-177.

19. Lema PP, Girard C, Vachon P. Evaluation of dexamethasone for the treatment of intracerebral hemorrhage using a collagenase-induced intracerebral hematoma model in rats. *J Vet Pharmacol Ther.* 2004;27(5):321-328.
20. Lema PP, Girard C, Vachon P. High doses of methylprednisolone are required for the treatment of collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Can J Vet Res.* 2005;69(4):253-259.
21. Savard C, Lema PP, Helie P, Vachon P. Effects of timing of dexamethasone treatment on the outcome of collagenase-induced intracerebral hematoma in rats. *Comp Med.* 2009;59(5):444-448.
22. Christensen H, Hermann M. Immunological response as a source to variability in drug metabolism and transport. *Front Pharmacol.* 2012;3:8.
23. Keep RF, Xiang J, Ennis SR, Andjelkovic A, Hua Y, Xi G *et al.* Blood-brain barrier function in intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl.* 2008;105:73-77.
24. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 2005;57(2):173-185.
25. Ronaldson PT, Davis TP. Targeting blood-brain barrier changes during inflammatory pain: an opportunity for optimizing CNS drug delivery. *Ther Deliv.* 2011;2(8):1015-1041.
26. Witt KA, Davis TP. CNS drug delivery: opioid peptides and the blood-brain barrier. *AAPS J.* 2006;8(1):E76-88.
27. Clark JD, Shi X, Li X, Qiao Y, Liang D, Angst MS *et al.* Morphine reduces local cytokine expression and neutrophil infiltration after incision. *Mol Pain.* 2007;3:28.

28. Martin JL, Koodie L, Krishnan AG, Charboneau R, Barke RA, Roy S. Chronic morphine administration delays wound healing by inhibiting immune cell recruitment to the wound site. *Am J Pathol.* 2010;176(2):786-799.
29. Statler KD, Alexander H, Vagni V, Dixon CE, Clark RS, Jenkins L *et al.* Comparison of seven anesthetic agents on outcome after experimental traumatic brain injury in adult, male rats. *J Neurotrauma.* 2006;23(1):97-108.
30. Niu L, Cao B, Zhu H, Mei B, Wang M, Yang Y *et al.* Impaired in vivo synaptic plasticity in dentate gyrus and spatial memory in juvenile rats induced by prenatal morphine exposure. *Hippocampus.* 2009;19(7):649-657.
31. Armitage-Chan EA, Wetmore LA, Chan DL. Anesthetic management of the head trauma patient. *J Vet Emerg Crit Care.* 2007;17(1):5-14.
32. Engelhard K, Werner C, Eberspacher E, Bachl M, Blobner M, Hildt E *et al.* The effect of the alpha 2-agonist dexmedetomidine and the N-methyl-D-aspartate antagonist S(+)-ketamine on the expression of apoptosis-regulating proteins after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Anesth Analg.* 2003;96(2):524-531.
33. Attal N, Brasseur L, Parker F, Chauvin M, Bouhassira D. Effects of gabapentin on the different components of peripheral and central neuropathic pain syndromes: a pilot study. *Eur Neurol.* 1998;40(4):191-200.
34. Castel A, Vachon P. Gabapentin reverses central pain sensitization following a collagenase-induced intrathalamic hemorrhage in rats. *J Pain Res.* 2013;7:5-12.
35. Yang F, Fu H, Lu YF, Wang XL, Yang Y, Yang F *et al.* Post-stroke pain hypersensitivity induced by experimental thalamic hemorrhage in rats is region-specific and demonstrates limited efficacy of gabapentin. *Neurosci Bull.* 2014;30(6):887-902.

Figures

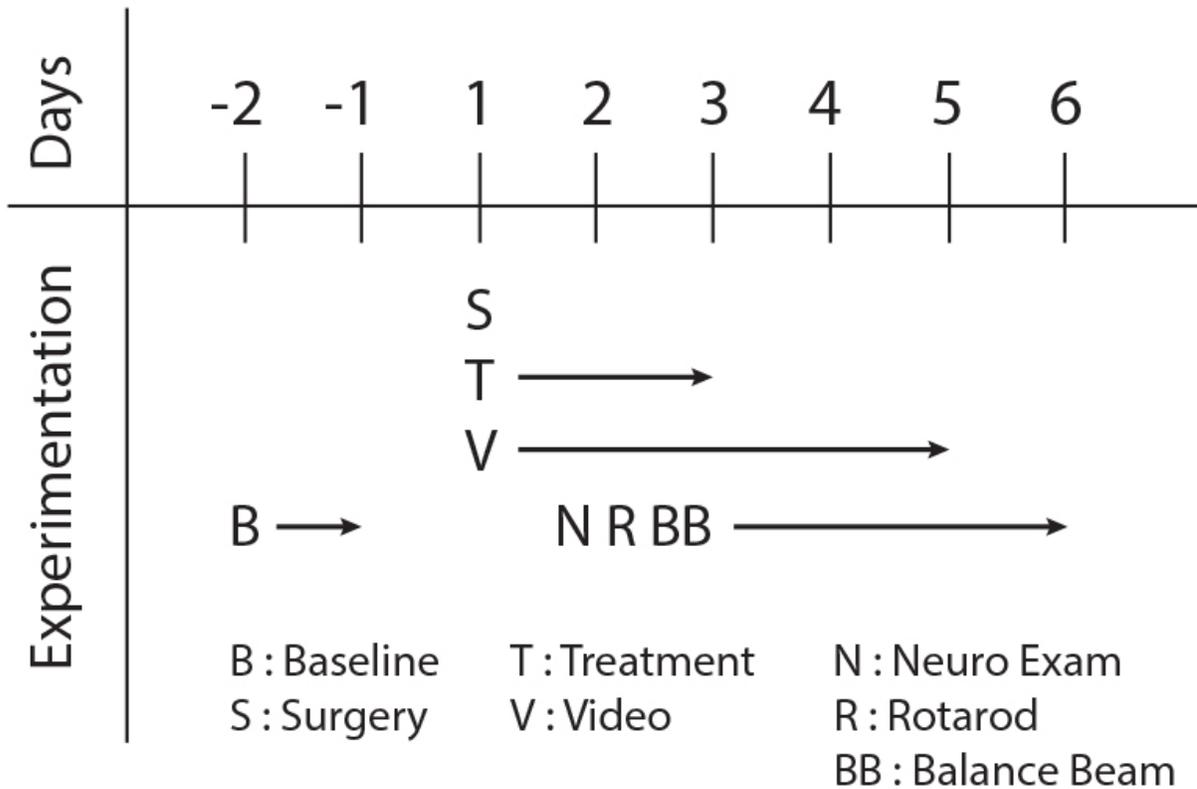


Figure 1. Study protocol timeline.

A week prior to the surgery, all rats were accustomed to the neurological and motor tests for 5 days and baseline scores were recorded on the last 2 days. Stereotaxic surgeries were performed (day 1) and all animals were treated 2 h following the surgery and on 2 subsequent (days 2 and 3). Each rat was filmed before and after treatments and on days 4 and 5. The neurological exam, the balance beam test and the rotarod test were performed on days 2 to 6.

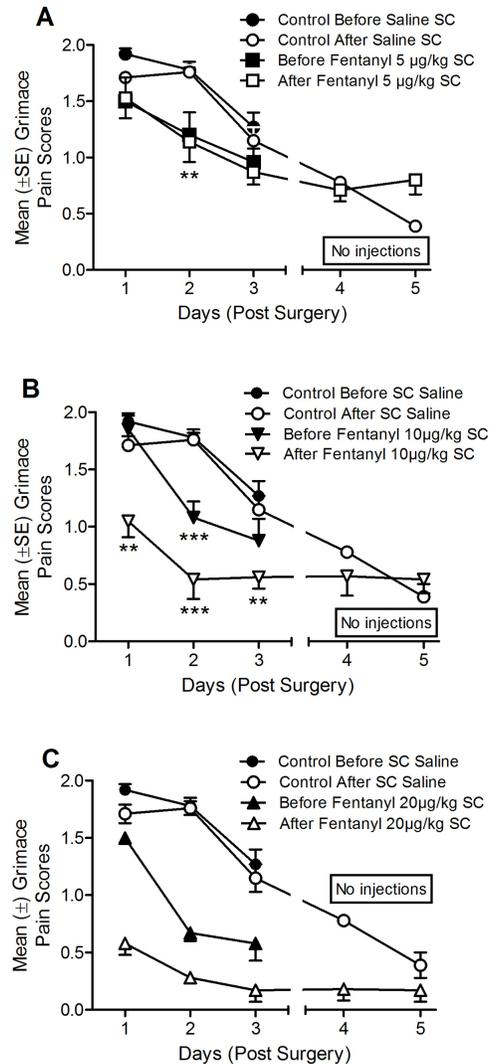


Figure 2. Grimace pain scores for saline and fentanyl treatment groups.

The surgery was performed on day 1. The fentanyl 5 µg/kg treatment group (A) showed a significant difference with controls only on day 2 before and after the SC injection. The 10 µg/kg fentanyl treatment group (B) showed a significant difference with controls after injection on day 1, before and after injections on day 2. On day 3 only post-fentanyl administrations alleviated pain. No differences were noted on days 4 and 5, on which animals were not treated. Due to the small number of subject ($n = 3$), no statistic was performed for the 20 µg/kg of fentanyl treatment group (C). Results for the 20 µg/kg treatments seem to follow the same tendency as the 10 µg/kg treated animals although the analgesic response appears much more important for these animals. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

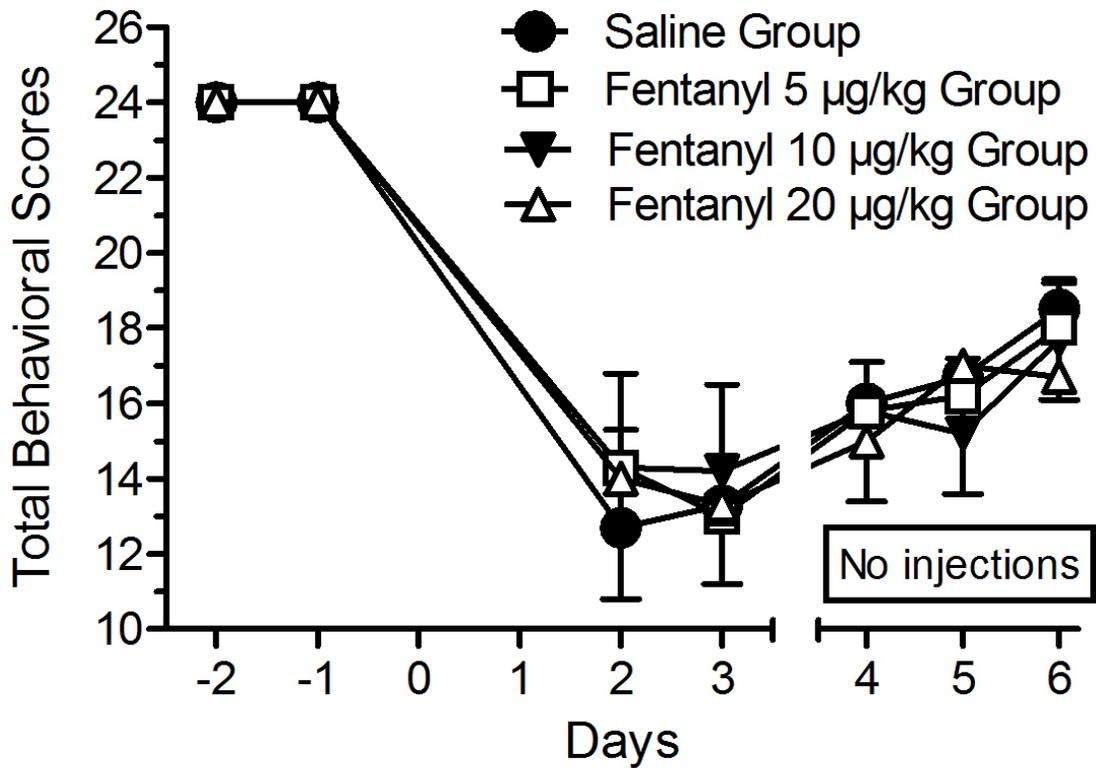


Figure 3. *Neurological exam scores.*

All groups were severely affected following the surgery (60-65% of baseline scores on the day following the surgery) and recuperated gradually over time (up to 75-80% of their baseline score on day 6). No significant difference is seen between control and treatment groups.

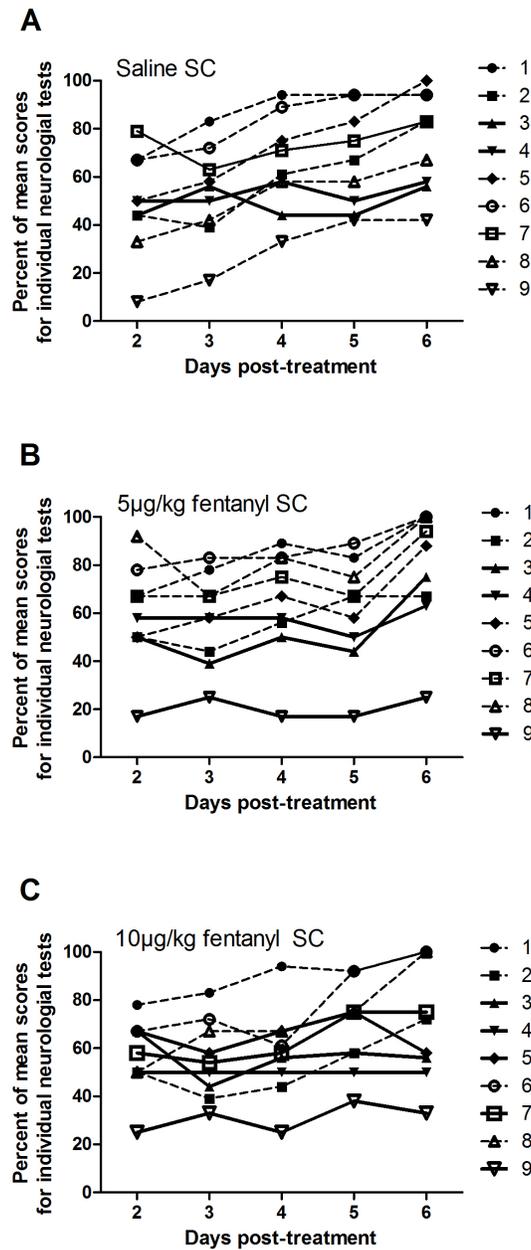


Figure 4. Results for individual neurological tests.

There is a statistically significant difference for the hopping score as function over time for the saline (A) treated animals ($P < 0.01$). There is no significant difference in function of time for the 5 days (no amelioration with time) for the hopping test following the 5 (B) and 10 (C) $\mu\text{g}/\text{kg}$ fentanyl treatments. 1: activity, 2: locomotion, 3: visual positioning, 4: tremor, 5: pelvic limbs hypertonicity, 6: tail rigidity, 7: climbing, 8: positional passivity, 9: hopping.

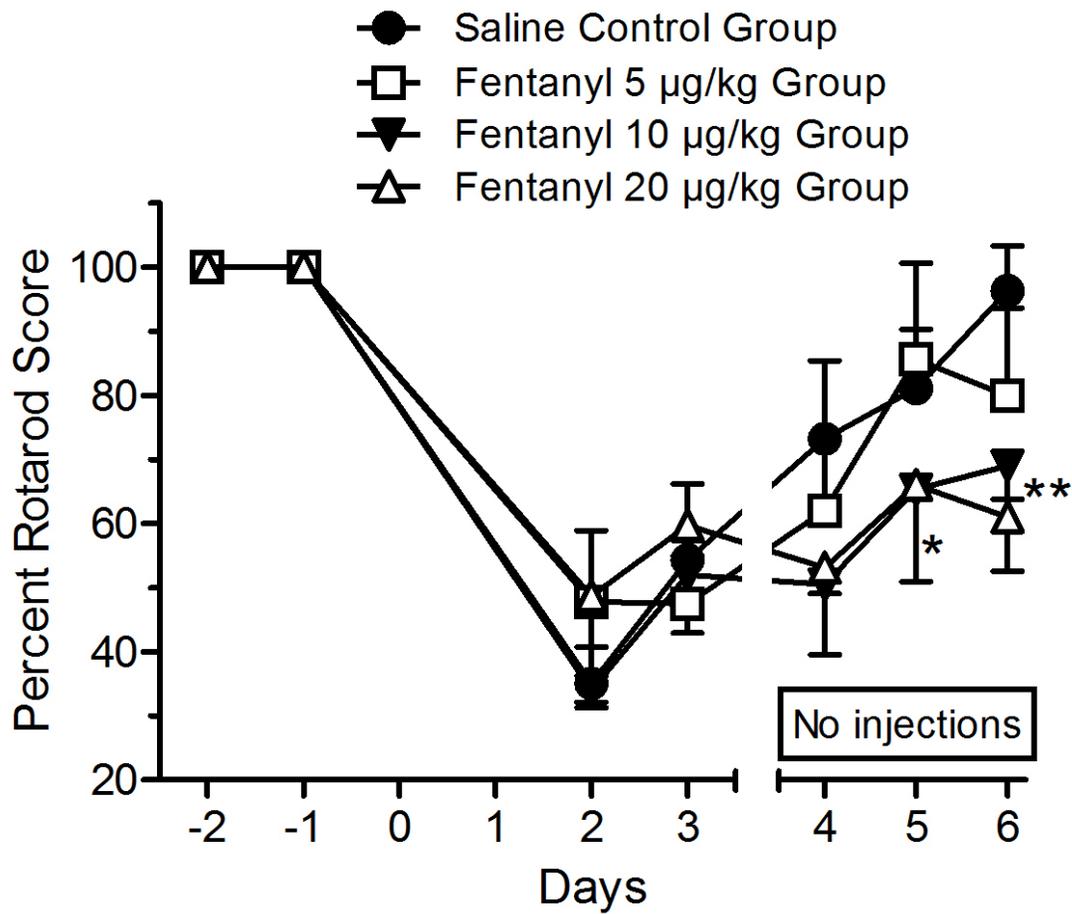


Figure 5. *Rotarod treadmill test.*

*All groups were severely affected following the surgery (35-50% of baseline scores on the day 2) and recuperated gradually over time. Only the 10 µg/kg fentanyl treatment showed significant a priori differences on days 5 and 6, animals performing more poorly on these days. No statistic was performed for the 20 µg/kg fentanyl group (n = 3), however they seem to follow the same trend as the 10 µg/kg treatment group. * P<0.05, ** P<0.02*

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'hémorragie intracérébrale est la lésion principale lors du trauma crânien et le précurseur de dommages secondaires et de neuroinflammation. Les dysfonctions neurologiques ne se produisent pas toujours au moment de l'impact, mais progressent dans le temps avec l'étendue des lésions créées par les cellules inflammatoires et l'augmentation de la pression intracrânienne due à l'accumulation de sang dans le parenchyme cérébral (1, 2). Cependant, il s'avère très difficile de prévenir ces séquelles, principalement à cause de la paucité de traitements reconnus efficaces et du manque de données de qualité dans la littérature scientifique (3, 4). D'ailleurs, l'aspect le plus méconnu de l'hémorragie intracérébrale est la douleur reliée à celle-ci. Il est donc important de mettre en place des protocoles analgésiques adéquats, non seulement pour éviter les mécanismes de sensibilisation menant à des douleurs chroniques (113), mais aussi pour aider au prompt rétablissement du patient (101). De plus, lors d'hémorragie intracérébrale, il y a bris de la barrière hémato-encéphalique qui ne peut plus remplir sa fonction de filtration des molécules allant au cerveau. En médecine humaine, on préfère donc promouvoir la prudence lors d'utilisation d'analgésiques, car on pense qu'ils peuvent faire des dommages supplémentaires aux fonctions cognitives et motrices des patients souffrant d'hémorragie intracérébrale (1).

Pour ce projet de recherche, nous avons reproduit un modèle d'hémorragie intracérébrale avec injection de collagénase en créant des lésions dans les noyaux gris de la base chez le rat. Ce modèle a d'abord été décrit par Rosenberg *et al.* (76), puis repris par plusieurs autres chercheurs dans le domaine, comme Chesney *et al.* (92), Del Bigio *et al.* (155) et Vachon *et al.* (84-86). Vingt et un rats Sprague-Dawley étaient divisés en 4 groupes, chacun

recevant une dose différente de fentanyl ou encore de la saline pour le groupe contrôle, et ce pendant 3 jours, dans l'objectif d'évaluer le soulagement de la douleur et de caractériser les fonctions neurologiques et motrices. Pour ce faire du jour 2 à 6 de l'expérimentation, nous avons utilisé l'échelle de grimace des rats de Sotocinal (136) pour évaluer la douleur, un examen neurologique pour noter l'ampleur des déficits, ainsi que le rotarod et le test de la poutre pour juger des capacités motrices. Tous ces tests ont d'abord été pratiqués chez les groupes de rats une semaine précédant la chirurgie pour déterminer une ligne de base.

1. Évaluation de la douleur

Durant les 5 premiers jours de l'expérimentation, des vidéos étaient prises chaque matin pour évaluer la douleur chez les sujets. Lors des 3 jours de traitement, une vidéo était faite avant l'injection et une autre après l'injection. Ces enregistrements étaient ensuite analysés, par un observateur aveugle à l'identification des groupes, en utilisant le manuel d'instruction pour l'échelle de grimace des rats de Sotocinal (136). Chaque vidéo était notée (0: Absent; 1: modéré ou équivoque; 2 : prononcé) selon l'intensité des expressions faciales (resserrement orbital, écrasement du nez et des joues, positionnement des oreilles et positionnement des moustaches) puis une moyenne était faite pour chaque jour selon le groupe (136). Cette façon de codifier les faciès a démontré une excellente fiabilité inter-observateur et aussi intra-observateur (avec respectivement 0.85 [0.78 – 0.90 95% CI] & 0.83 [0.76 – 0.89]) (137). D'ailleurs, plusieurs études ont déjà utilisé cette méthode avec un haut taux de succès pour évaluer la douleur chez les rats autant en temps réel (156) que rétrospectivement par vidéo (157, 158).

Nos résultats ont démontré qu'il était possible de soulager de façon substantielle la douleur due à l'hémorragie intracérébrale chez le rat avec une dose de fentanyl SC de 10 µg/kg. Cet effet semblait même de longue durée puisque les rats démontraient moins de douleur de façon significative au jour 1 après l'injection de fentanyl, mais aussi au jour 2 avant et après le traitement, et aussi au jour 3 après l'injection. Habituellement, le fentanyl est considéré comme un médicament de très courte action, mais il a été démontré dans certains articles que lorsqu'injecté en SC chez un rat en santé son effet pouvait durer entre 90-120 minutes (159). De plus, lorsqu'il y a inflammation, la pharmacocinétique des médicaments change leur métabolisation dans le corps et le fonctionnement de leurs transporteurs d'un compartiment à l'autre. Les effets cliniques sont donc difficiles à prédire, mais il est possible que les concentrations des molécules soient altérées de façon systémique ou locale (160). Aussi, il a été démontré que chez l'humain, l'inflammation cérébrale peut perturber l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique permettant le passage dans le neuroparenchyme des macromolécules qui seraient normalement retenues dans les vaisseaux sanguins par les jonctions serrées entre les cellules endothéliales, par l'absence de fenestration, par l'endocytose limitée ou encore par la présence d'enzymes métabolisant les composés neuroactifs (161, 162). Ce phénomène augmente la perméabilité de cette barrière donnant ainsi l'opportunité aux molécules comme les opioïdes de passer directement dans le cerveau et de s'y accumuler rapidement, augmentant ainsi leur puissance et donc leurs effets (163, 164). Il est donc ardu dans ces conditions de connaître la durée exacte des effets analgésiques du fentanyl chez nos rats. Cependant, nous pouvons dire avec certitude que la durée d'action est augmentée, puisque les rats ont non seulement été soulagés les jours 1, 2 et 3 après l'injection,

mais aussi de façon significative avant le traitement du jour 2. En prévenant la sensibilisation du système nerveux central sans causer de changement à leur motricité.

2. Neurotoxicité

Le groupe de fentanyl 20 µg/kg a été réduit à 3 individus lorsque nous avons remarqué des signes de toxicité chez les premiers sujets. En effet, ils démontraient une phase de catalepsie et de rigidité corporelle pendant 15 à 20 minutes après l'injection de fentanyl. Lors de la prise de vidéo (1h post-injection), les rats ne démontraient plus ces caractéristiques. Ces symptômes dénotaient clairement des signes de surdosage, et ce malgré que la dose ait été bien en deçà des dosages recommandés pour atteindre un effet analgésique chez le rat en santé qui se situent entre 40 µg/kg et 160 µg/kg (159). Ces observations concordent avec ce que les cliniciens savaient déjà par expérience, c'est-à-dire que lorsque la barrière hémato-encéphalique est brisée, les molécules s'accumulent beaucoup plus facilement dans le cerveau et il faut donc faire très attention au dosage des drogues utilisées chez ces patients (151). La croyance générale est que les molécules entrent dans le cerveau via la voie sanguine, cependant certaines données démontreraient que la situation est plus complexe qu'elle en a l'air. En effet, lors d'un trauma crânien, la perméabilité de la barrière suivrait un patron spatial et temporel hétérogène, généralement biphasique (165). Pour ce qui est du modèle d'injection de collagénase, il y aurait une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique après 30 minutes, puis qui perdurerait à un degré moindre de 5h à 7 jours, la perméabilité ne retournant à la normale qu'au jour 14 (166). Chez l'humain, il y a aussi des preuves de perturbation de la perméabilité au niveau vasculaire en période aiguë du trauma crânien, cependant elle peut aussi perdurer plusieurs jours, voir même des années (167, 168).

Donc vu la sévérité des symptômes chez nos rats à 20 µg/kg de fentanyl, il a été décidé de ne pas combler ce groupe jusqu'à 6 individus pour la sécurité des sujets et leur bien-être, rendant les données recueillies non significatives à cause du trop faible nombre de participants. Cependant, les résultats sont néanmoins révélateurs de certaines tendances et donc tout de même pertinents et intéressants pour cette étude.

3. Évaluation de la motricité

Pour ce qui est de l'évaluation des fonctions motrices, nous avons utilisé le rotarod. Ce test nous permettait d'estimer la force de préhension, l'équilibre et la coordination motrice. Suivant les vidéos pour la douleur, le rotarod était performé à la fin des autres tests neurologiques et moteurs au jour 2 à 6.

Nos résultats pour ce test démontrent clairement qu'après la chirurgie, tous les groupes ont une diminution de performance significative par rapport à leur ligne de base de la semaine précédente. Ces résultats à la baisse ont déjà été rapportés dans nos autres études qui utilisaient aussi le même modèle de collagénase aux coordonnées des noyaux gris de la base (85, 86). Cependant, il est possible d'observer une amélioration progressive, et ce pour tous les groupes, sauf pour le groupe 10 µg/kg au jour 5 et 6. Durant ces deux jours, ils ont performé de façon significativement plus basse que les groupes de saline et de 5 µg/kg. Ces données sont aussi corroborées par les résultats du groupe 20 µg/kg qui suivent la même tendance au jour 5 et 6. Cependant, ces données ne peuvent être significatives puisque le nombre d'individus (n=3) dans ce groupe est trop peu nombreux. Le groupe témoin (*sham*) a produit des résultats semblables aux données de la ligne de base, démontrant ainsi que la motricité n'était pas affectée par les effets étourdissants du fentanyl (10 µg/kg), mais bien par les déficits causés

par l'hémorragie intracérébrale combinée à l'injection de fentanyl. Dans la littérature scientifique, il n'y a aucun article qui traite des effets du fentanyl sur les fonctions motrices utilisant le rotarod lors d'un trauma crânien.

4. Évaluation des déficits neurologiques

L'examen neurologique était composé de neuf tests semi-quantitatifs (activité, locomotion, positionnement visuel, passivité positionnelle, facilité de grimper, rigidité de la queue, tremblement, hypertonicité et sautellement) pour juger de la gravité des déficits neurologiques et de leur niveau de récupération durant l'expérimentation. Lorsque l'on observe la moyenne des scores de ces tests par groupe, il n'y a pas de différence a priori entre les groupes. Ils sont tous partis à 60-65% du niveau de base et ont ensuite amélioré leur performance jusqu'à 75-80% au jour 6. Ces résultats sont similaires à d'autres articles utilisant un modèle identique au nôtre (84-86). Cependant, lorsque les tests sont pris individuellement, il est possible d'observer une démarcation du test de sautellement. En effet, le score est toujours au plus bas le premier jour, mais le groupe de saline s'améliore rapidement au cours des six jours suivants. Cependant, les groupes de fentanyl ne démontrent aucune amélioration significative tout au long de l'étude. Ce phénomène recoupe les faibles résultats du rotarod pour le groupe 10 et 20 µg/kg aux jours 5 et 6. Ces deux tâches sont associées à la proprioception spatiale, et elle serait donc plus affectée par l'emploi du fentanyl lors d'hémorragie intracérébrale, diminuant ainsi ses performances. Aucun autre article ne discute des déficits neurologiques possibles avec l'utilisation de fentanyl lors d'hémorragie intracérébrale causée par un trauma crânien.

5. Le test de la poutre

Le test de la poutre a été choisi pour évaluer la motricité, la coordination motrice fine et l'équilibre. Les rats devaient se déplacer sur un goujon de bois de 80cm élevé au-dessus d'un espace ouvert. Le temps de traversée était enregistré, ainsi que le nombre de pertes d'équilibre. Si l'animal tombait, alors la distance parcourue était notée. Les résultats après l'hémorragie intracérébrale sont cependant décevants, et ne nous ont pas fourni l'information que nous avions espérée. Au début tous les animaux tombaient immédiatement, puis au jour 6, ils tenaient tous en équilibre sur la poutre, mais étaient incapables de se déplacer. La seule différence est que les groupes de fentanyl se sont tenus en équilibre plus rapidement que le groupe contrôle, probablement dû à moins de douleur ressentie. Cependant, au jour 3 tous les groupes ont eu des performances semblables jusqu'à la fin de l'expérimentation. Nous avons donc conclu que ce test était trop exigeant pour le genre de déficits moteurs causés par une hémorragie intracérébrale et qu'il ne valait pas la peine de l'utiliser dans un contexte similaire à l'avenir.

D'autres études sur l'hémorragie intracérébrale ont utilisé le test de la poutre avec des résultats différents. Chez Statler par exemple, les animaux ayant le traitement de fentanyl réussissaient à parcourir la poutre après quelques jours et à se balancer (169). Cependant, cette expérimentation utilisait le modèle d'hémorragie intracérébrale d'impact cortical contrôlé, ce qui ne crée pas le même type de lésion que l'injection de collagénase, les dommages étant souvent moins sévères. Ensuite, Lekic dans son étude emploie la collagénase et seulement le balancement sur la poutre pendant une période de 60 secondes, il ne prend pas en compte le déplacement sur la poutre. Pourtant, ses sujets sont capables de se tenir en équilibre sur la poutre dès le jour 1 même pour quelques secondes, pour ensuite s'améliorer progressivement

(170). Malgré un départ plus laborieux pour nos groupes, la tendance reste la même pour le balancement. De plus, ses coordonnées d'injection sont différentes des nôtres et n'atteignent donc pas les noyaux gris de la base, ce qui peut expliquer la moindre intensité des déficits moteurs et leur récupération un peu plus rapide.

6. Histopathologie

Au dernier jour de l'expérimentation, les rats étaient euthanasiés, puis leur cerveau prélevé pour l'évaluation histopathologique. Trois colorations différentes ont été utilisées : l'hématoxyline-éosine pour calculer le volume de l'hématome, le GFAP pour déterminer le nombre d'astrocytes réactifs et la coloration Fluoro-Jade® B pour compter le nombre de neurones nécrotiques. Après lecture des lames par un observateur aveugle aux différents groupes, aucune différence significative n'a été trouvée entre le groupe de saline et ceux de fentanyl. Le volume de l'hématome, le nombre de neurones nécrotiques et le nombre d'astrocytes réactifs étaient tous similaires d'un individu à l'autre. Ces résultats sont similaires à ceux de Statler pour son groupe de fentanyl versus son groupe contrôle, il n'y avait aucune différence au niveau du volume de l'hématome ni pour le taux de survie des neurones de l'hippocampe (169). Ces données soutiennent le fait que la molécule de fentanyl n'a pas engendré des dommages cellulaires supplémentaires au cerveau lors d'hémorragie intracérébrale par rapport au groupe contrôle.

7. Explication possible des déficits moteurs chez le groupe de fentanyl 10 µg/kg

La morphine, un opioïde proche du fentanyl, a été reconnue pour inhiber la production de cytokine lors d'inflammation et même avec un usage chronique, elle pouvait diminuer le

recrutement des neutrophiles et macrophages au site de l'insulte (171, 172). Ces données pourraient nous laisser présager que le fentanyl serait neuroprotecteur et réduirait les dommages causés par la neuroinflammation lors d'hémorragie intracérébrale. Cependant les résultats d'histopathologie ne vont pas dans ce sens. De plus, le groupe de 10 µg/kg a démontré de façon significative (ainsi que le groupe 20 µg/kg non statistiquement significatif) des retards de performance pour le rotarod ainsi que pour le test de sautillerment, bien qu'encore une fois les lésions cérébrales n'étaient pas aggravées par le fentanyl. Ce manque d'amélioration de ces groupes vient donc d'un autre mécanisme que la destruction primaire du neuroparenchyme. Une autre étude similaire, sur différents produits anesthésiques lors de trauma crânien, nous montre que le fentanyl et la morphine étaient associés aux pires résultats en ce qui a trait aux fonctions motrices et cognitives (169). Ces molécules n'avaient donc aucun effet neuroprotecteur et n'ont pas prévenu la neuroinflammation et les dommages secondaires subséquents associés aux hémorragies cérébrales. Tout comme dans notre étude, le volume de l'hématome n'était pas augmenté par les différents traitements analgésiques (169). Donc, le manque de performance du groupe 10 µg/kg de fentanyl pourrait possiblement s'expliquer par une interférence fonctionnelle de la drogue. Suivant cette même piste, un autre groupe de scientifiques a démontré que la morphine, un autre opioïde agoniste, faisait entrave à la restructuration des synapses cérébrale chez des rats nouveaux nés (173). Ces déficits cognitifs pourraient être causés par un changement dans l'inhibition GABAergique qui contrôle l'excitation neuronale. De plus, chez les rats exposés à la morphine en période prénatale il est possible d'observer une perte de neurones contenant du GABA dans la région du gyrus dentelé de l'hippocampe. Ce phénomène affecterait la plasticité synaptique et la mémoire spatiale des rats (173). Il est tentant d'extrapoler cette hypothèse aux résultats

retrouvés dans notre étude. Cependant, les conditions d'expérimentation n'étant pas les mêmes, il est difficile de conclure avec assurance que ce mécanisme est similaire chez nos sujets. De plus, il n'y a aucune publication connue étudiant les effets du fentanyl sur la plasticité neuronale, ce qui nous laisse dans les conjectures. Aussi, il faut noter que les capacités motrices du groupe 10 µg/kg de fentanyl étaient encore en mode de récupération. Il est donc possible qu'avec assez de temps ces individus auraient rattrapé les performances des autres groupes.

8. Poids corporel

Tous les groupes formant cette étude étaient constitués de rats Sprague-Dawley âgés entre 10 à 12 semaines. Au jour 1 de l'expérience, avant la chirurgie, tous les rats étaient pesés, puis leurs poids (en grammes) étaient à nouveau enregistrés au jour 6 à la fin des tests comportementaux. Seul le groupe de contrôle injecté à la saline a pris significativement du poids lors de cette semaine d'expérimentation (7% du poids corporel du jour 1). Tous les autres groupes, incluant les *shams*, sont similaires et n'ont gagné aucune masse corporelle durant ce temps. Quelques individus hors normes ont même perdu jusqu'à 22% de leur poids initial. Ces résultats sont troublants, puisque des animaux de cet âge sont encore en croissance et devraient augmenter leur masse corporelle en moyenne de 7,5 à 14% en 1 semaine selon la charte de croissance de Charles River (174). Le groupe de saline est donc juste en dessous de cette estimation, mais les groupes recevant du fentanyl sont anormaux. Il serait pourtant facile de penser qu'un animal en douleur mangerait moins qu'un animal qui reçoit un analgésique, mais ce n'est vraisemblablement pas le cas ici. En fait, les opioïdes sont soupçonnés d'avoir un effet modulateur sur l'appétit par le biais des récepteurs dynorphine-κ et δ-endorphine-ε

qui augmenteraient la prise de nourriture chez les rats. Cependant le récepteur μ pourrait avoir un l'effet contraire et leur causer de l'anorexie (175). Toutefois, ce phénomène n'est pas beaucoup étudié et les effets secondaires des opioïdes peuvent être variables entre chaque individu et ne sont pas toujours transposables d'une espèce à l'autre. Néanmoins, il est important dans le cas de notre étude de prendre en compte un équilibre entre le soulagement de la douleur maximal et une prise alimentaire suffisante.

9. Genre & âges des animaux

Dans notre étude, tous nos sujets étaient de jeunes rats mâles, mais il est pertinent de se demander si nos résultats auraient pu être influencés par le choix du genre et de l'âge. En premier lieu, il est répertorié dans la littérature en médecine humaine que les femmes sont beaucoup plus susceptibles de développer des maux de tête et même que le sexe féminin est un prédicteur de céphalée plus significatif que le volume de l'hémorragie intracérébrale (111, 114, 176, 177). Donc des rates pourraient être plus susceptibles de ressentir la douleur secondaire à l'hémorragie intracérébrale. Cependant, la fiabilité de l'échelle de grimace des rats pour apprécier l'intensité de la douleur chez les sujets a été démontrée équivalente pour les deux genres (136). Donc, même si un groupe avait plus douleur, il serait possible de détecter cette différence avec la méthode de Sotocinal. De plus, avec un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat, l'estrogène s'est avéré être un neuroprotecteur pour une dose physiologique et possiblement dommageable avec une dose supraphysiologique (178, 179). En fait, l'estrogène physiologique réduirait le stress oxydatif, les mécanismes d'apoptose, l'inflammation, la régulation des facteurs de croissance et la modulation vasculaire (179). Avec l'utilisation d'un modèle d'injection de sang entier chez les souris, Nakamura *et al.* ont

observé qu'il y avait significativement moins d'œdème cérébral chez les femelles trois jours après la chirurgie et qu'elles récupéraient beaucoup plus rapidement au niveau de leurs déficits neurofonctionnels par rapport à leur contrepartie masculine (180). Ces observations ont aussi été faites chez la rate où l'œdème cérébral était moindre (181) et qui semble mieux tolérer l'hémorragie intracérébrale que le mâle (49). Les femelles seraient moins susceptibles aux lésions cérébrales ischémiques, hémorragiques et traumatiques (49). Donc, l'utilisation des mâles qui n'ont pas de cycle œstral réduit la variabilité expérimentale chez les sujets de l'étude (178). Cependant, il est primordial lors d'essais cliniques plus poussés de prendre en compte cette variabilité et d'inclure des individus des deux sexes, puisque la population affectée par l'hémorragie intracérébrale n'est pas exclusivement masculine.

Pour ce qui est du jeune âge de nos sujets, il a été démontré chez l'humain que l'âge était le prédicteur principal du pronostic fonctionnel des patients (182). En effet, les rats plus âgés manifestent un profil inflammatoire différent des jeunes, autant de manière quantitative que temporelle (183). Gong *et al.* ont d'ailleurs observé que les rats plus âgés souffrant d'hémorragie intracérébrale exhibaient des déficits neurologiques plus grands, une œdème cérébrale plus sévère, une induction des protéines de choc thermique et une activation plus intense de la microglie. En contrepartie, la réactivité des astrocytes était moindre autour de l'hématome (184). Toutes ces données nous suggèrent qu'il faut faire attention à l'extrapolation de nos résultats sur une plus large population.

10. Environnement

Nos rats étaient logés dans des cages standard deux par deux avec un tube de PVC. Ces dispositions sont minimales en matière d'enrichissement pour le bien-être des rats. Cependant

lors d'un modèle de trauma crânien d'impact cortical contrôlé, il a été prouvé qu'un milieu plus enrichi, comportant une cage de 3 étages avec échelles, jouets variés et changeants, ainsi que du matériel de nidification, améliorerait grandement les bénéfices au niveau du volume de la lésion cérébrale, des comportements neurologiques et cognitifs et des résultats histologiques, et ceci peu importe que le groupe ait passé un temps continu ou par périodes dans cet environnement (185). Il est donc important de considérer l'environnement lors de la planification de l'étude si l'on veut pouvoir comparer nos résultats à d'autres expériences similaires et éviter les variabilités. Cependant pour le patient humain, ceci indique qu'un environnement de récupération stimulant pourrait être très bénéfique dans son cheminement vers la guérison.

11. Limitations de l'étude & études complémentaires possibles

L'utilisation d'une seule drogue est une des limitations de cette étude. En effet, il serait très intéressant de reproduire cette expérience avec diverses molécules analgésiques pour vérifier leurs effets bénéfiques, dans l'espoir qu'elles permettent un meilleur rétablissement cognitif et moteur. Un choix intéressant pourrait être la kétamine, un antagoniste NDMA avec des propriétés analgésiques et dissociatives, puisqu'elle a des effets anti-excitotoxiques et anti-apoptotiques (186). Cependant, il a aussi été démontré qu'elle impliquait une faible survie neuronale de l'hippocampe et qu'elle pouvait exacerber l'hypoperfusion (169). D'autre part, le gabapentin serait une autre molécule intéressante à évaluer pour ses effets cognitif et moteur lors d'hémorragie intracérébrale, puisqu'elle agit sur la douleur neuropathique et est utilisée pour prévenir la sensibilisation centrale (187, 188). Cependant, les autres études l'ayant utilisé ne s'entendent pas sur son efficacité dans un contexte de douleur cérébrale (79).

Une autre limitation de cette étude est la courte durée de l'expérience. La période de 6 jours ne dévoile que les données de récupération et de déficits à court terme. Cependant, il est bien connu que le patient souffrant de trauma crânien passe par plusieurs phases d'effets secondaires sur le long terme (105, 168). Il serait donc pertinent de faire cette étude avec cette fois une optique de réhabilitation à longue échéance.

D'autres études complémentaires à celle-ci pourraient apporter des réponses pertinentes aux questions qu'a soulevées ce projet. Par exemple, un protocole expérimental qui permettrait de déterminer la concentration d'accumulation de la molécule analgésique dans le cerveau à divers temps post-injection. Et donc, découvrir combien de temps la molécule reste dans le tissu du parenchyme cérébral. Ceci permettrait de faire une estimation plus adéquate des dosages et des risques de neurotoxicité des molécules utilisées. Aussi, cela nous aiderait à mieux comprendre les mécanismes et leur efficacité lors que la barrière hémato-encéphalique est brisée.

Une autre perspective de recherche serait d'améliorer le design de cette étude en évaluant la pertinence d'ajouter d'autres tests pour évaluer l'état des sujets. Dans ce projet, le test d'équilibre de la poutre s'est avéré trop exigeant pour donner des résultats utilisables, cependant le fait même de l'avoir écarté apporte un élément supplémentaire à la banque de donnée de cette expérience. Il est donc recommandé d'essayer de nouveaux tests pour trouver les plus adéquats pour ce genre de modèle animal. Par exemple, il existe d'autres tests neurologiques qu'il serait intéressant d'inclure, comme la piscine de Morris qui constitue un labyrinthe aquatique qui évalue la mémoire du rongeur (189). Ou encore des tests plus quantitatifs comme mesurer en temps réel la pression intracrânienne des rats à l'aide de l'implantation d'une canule dans l'espace sous-arachnoïdien (190). Une grande diversité de

tests classiques ou non pourrait donc être utile pour évaluer les fonctions cognitives et motrices des rats.

De plus, l'investigation de la cause du manque de prise de poids chez les sujets recevant du fentanyl pourrait être le sujet d'une étude supplémentaire. Ces données n'ont été remarquées qu'à la fin du projet, il a donc été impossible d'introduire un protocole de surveillance de la consommation de nourriture et des pesées régulières. Il serait donc intéressant de comprendre pourquoi seuls les rats recevant de la saline ont pris du poids de façon normale, alors que ceux qui recevaient de l'analgésie, et qui étaient donc plus confortables, n'en prenaient pas.

Un autre aspect, qui mériterait plus d'attention dans ce projet, est l'évaluation du nombre et de l'activation de microglies et des macrophages. Ces cellules immunitaires du parenchyme cérébral ont un rôle à jouer lors de neuroinflammation. Il serait pertinent d'en préciser l'importance lors d'hémorragie intracérébrale et de l'utilisation de fentanyl ou d'autres analgésiques.

Cette étude a apporté des données pionnières dans le domaine du traitement de la douleur chez les patients souffrant d'hémorragie intracérébrale. Bien que ce ne soit pas des résultats directement transposables à l'humain, ils apportent un point de départ pour la recherche d'un protocole d'algologie adéquat dans le contexte d'un trauma crânien. D'autres projets pourront bénéficier de ces données pour bâtir leur propre protocole.

12. Vérification de l'hypothèse

Notre hypothèse de départ supposait que le fentanyl allait soulager les douleurs des rats souffrant d'hémorragie intracérébrale. Cette proposition a été validée grâce à l'échelle de

grimace des rats pour une dose de fentanyl de 10 µg/kg qui a procuré un soulagement d'une durée de plusieurs heures. Ensuite, selon nos analyses histopathologiques, nous n'avons pas observé de changements significatifs au niveau tissulaire des cerveaux des rats entre les groupes, confirmant encore une fois notre hypothèse. Bien que la plupart des tests neurologiques et moteurs ne démontraient aucune différence entre les groupes, le rotarod et le test de sautillerment présentaient quant à eux une baisse de performance notable pour les individus qui recevaient plus de 10 µg/kg de fentanyl. Ces résultats rejettent donc cette section de notre hypothèse qui stipulait qu'il n'y aurait pas de changements significatifs. Néanmoins, le but avoué de cette étude était de faire avancer la science dans le domaine, mais aussi de trouver une solution de traitement pour soulager la douleur des rats utilisés dans les modèles de recherches en trauma crânien. Donc, selon le protocole d'étude et si la motricité n'est pas l'aspect visé, l'utilisation du fentanyl est possible sur ces rats puisque les changements moteurs sont minimes. Leur récupération et leur bien-être pourraient donc être maximisés en période post-traumatique.

CONCLUSION

Ce projet a permis d'approfondir les connaissances sur les changements cognitifs et moteurs lors d'hémorragie intracérébrale dans les noyaux gris de la base chez le rat. Il a aussi permis d'évaluer les effets secondaires et analgésiques de différentes doses d'un opioïde, en l'occurrence le fentanyl. L'échelle de grimaces des rats a été un outil essentiel dans ce projet pour permettre d'évaluer la douleur et le soulagement de celle-ci chez le rat. L'examen neurologique et le rotarod se sont avérés des tests pertinents pour mesurer la récupération des fonctions de façon qualitative et quantitative. Le test de la poutre s'est révélé trop exigeant pour fournir des données significatives lors de telles lésions cérébrales, il ne serait pas recommandé dans une expérience similaire.

Avec les résultats obtenus lors de cette expérimentation, il est possible de conclure que l'utilisation de fentanyl avec une dose de 10 µg/kg SC peut soulager la douleur causée par une hémorragie intracérébrale chez le rat. Cette analgésie semble sécuritaire et efficace, cependant elle peut avoir certains effets sur les fonctions motrices, en l'occurrence le test de sautillerment et le rotarod. Ignorer ces possibles effets lors de la planification d'une étude expérimentale future pourrait entraîner un biais majeur. Donc, nous recommandons d'utiliser une dose de 10 µg/kg de fentanyl pour apaiser la douleur associée à un modèle de rat de trauma intracrânien, tout en tenant compte des déficits encourus possibles dans le protocole de l'étude.

Ce projet propose des données de base précurseuses pour l'essor de plusieurs futures études de recherches utilisant le modèle de collagénase chez le rat. Plusieurs autres molécules analgésiques pourraient être testées par le même design d'étude, pour évaluer leur efficacité

sur la douleur des céphalées ainsi que leurs effets secondaires. Aussi, d'autres examens cognitifs et moteurs en plus de la surveillance plus rapprochée des signes vitaux pourraient être validés par ce modèle d'expérimentation pour apporter plus de données sur la récupération des sujets. Une étude à long terme pourrait également révéler des informations additionnelles par rapport au rétablissement sur plusieurs semaines voir des mois des rats. De plus, une étude additionnelle visant l'évaluation de la microglie et des macrophages dans le cortex cérébral lors de telles expérimentations permettrait de préciser les données histopathologiques.

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

1. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2007;24 Suppl 1:S1-106. Epub 2007/05/22.
2. Lu J, Marmarou A, Choi S, Maas A, Murray G, Steyerberg EW. Mortality from traumatic brain injury. *Acta Neurochir Suppl*. 2005;95:281-5. Epub 2006/02/09.
3. Morgenstern LB, Hemphill JC, 3rd, Anderson C, Becker K, Broderick JP, Connolly ES, Jr., et al. Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2010;41(9):2108-29. Epub 2010/07/24.
4. Jauch EC, Saver JL, Adams HP, Jr., Bruno A, Connors JJ, Demaerschalk BM, et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2013;44(3):870-947. Epub 2013/02/02.
5. Corrigan JD, Selassie AW, Orman JA. The epidemiology of traumatic brain injury. *J Head Trauma Rehabil*. 2010;25(2):72-80. Epub 2010/03/18.
6. Maas AI, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol*. 2008;7(8):728-41. Epub 2008/07/19.
7. Dewey CW. Emergency management of the head trauma patient. Principles and practice. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2000;30(1):207-25, vii-viii. Epub 2000/02/19.
8. Hopkins AL. Head Trauma. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 1996;26(4):875-91.
9. Platt SR, Radaelli ST, McDonnell JJ. The prognostic value of the modified Glasgow Coma Scale in head trauma in dogs. *J Vet Intern Med*. 2001;15(6):581-4. Epub 2002/01/31.
10. Proulx J, Dhupa N. Severe brain injury. Part I. Pathophysiology. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. 1998;20(8):897.
11. Tajiri N, Acosta SA, Shahaduzzaman M, Ishikawa H, Shinozuka K, Pabon M, et al. Intravenous Transplants of Human Adipose-Derived Stem Cell Protect the Brain from Traumatic Brain Injury-Induced Neurodegeneration and Motor and Cognitive Impairments: Cell Graft Biodistribution and Soluble Factors in Young and Aged Rats. *J Neurosci*. 2014;34(1):313-26.

12. Hernandez-Ontiveros DG, Tajiri N, Acosta S, Giunta B, Tan J, Borlongan CV. Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury. *Front Neurol*. 2013;4:30. Epub 2013/03/28.
13. Belanger HG, Kretzmer T, Vanderploeg RD, French LM. Symptom complaints following combat-related traumatic brain injury: relationship to traumatic brain injury severity and posttraumatic stress disorder. *J Int Neuropsychol Soc*. 2010;16(1):194-9. Epub 2009/09/18.
14. Riggio S. Traumatic brain injury and its neurobehavioral sequelae. *Psychiatr Clin North Am*. 2010;33(4):807-19. Epub 2010/11/26.
15. Torbey MT, Bosel J, Rhoney DH, Rincon F, Staykov D, Amar AP, et al. Evidence-Based Guidelines for the Management of Large Hemispheric Infarction : A Statement for Health Care Professionals from the Neurocritical Care Society and the German Society for Neuro-Intensive Care and Emergency Medicine. *Neurocrit Care*. 2015. Epub 2015/01/22.
16. Ghajar J. Traumatic brain injury. *Lancet*. 2000;356(9233):923-9. Epub 2000/10/19.
17. The Internet Pathology Laboratory for Medical Education [En ligne]. USA: University of Utah, Eccles Health Sciences Library; 2016. CNS Pathology Index [cité le 14 déc 2016]; [environ 4 écrans]. Disponible: <http://library.med.utah.edu/WebPath/CNSHTML/CNSIDX.html> - 1
18. Fletcher DJ, Syring RS. Traumatic brain injury. Dans: Silverstein DC, Hopper K, rédacteurs. *Small animal critical care medicine*. St-Louis, Mo: Saunders Elsevier; 2009. p. 658-62.
19. Freeman C, Platt SR. Head trauma. Dans: Platt SR, Garosi LS, rédacteurs. *Small animal neurological emergencies*. London: Manson; 2012. p. 363-82.
20. Sande A, West C. Traumatic brain injury: a review of pathophysiology and management. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2010;20(2):177-90. Epub 2010/05/22.
21. Platt SR, Radaelli ST, McDonnell JJ. Computed tomography after mild head trauma in dogs. *Vet Rec*. 2002;151(8):243. Epub 2002/09/11.
22. Lozano D, Gonzales-Portillo GS, Acosta S, de la Pena I, Tajiri N, Kaneko Y, et al. Neuroinflammatory responses to traumatic brain injury: etiology, clinical consequences, and therapeutic opportunities. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2015;11:97-106. Epub 2015/02/07.

23. Brown SA, Hall ED. Role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of shock and trauma, with focus on central nervous system injuries. *J Am Vet Med Assoc.* 1992;200(12):1849-59. Epub 1992/06/15.
24. Ikeda Y, Long DM. The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurgery.* 1990;27(1):1-11. Epub 1990/07/01.
25. Chesnut RM, Marshall LF, Klauber MR, Blunt BA, Baldwin N, Eisenberg HM, et al. The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. *J Trauma.* 1993;34(2):216-22. Epub 1993/02/01.
26. Bouma GJ, Muizelaar JP, Bandoh K, Marmarou A. Blood pressure and intracranial pressure-volume dynamics in severe head injury: relationship with cerebral blood flow. *J Neurosurg.* 1992;77(1):15-9. Epub 1992/07/01.
27. Yu S, Kaneko Y, Bae E, Stahl CE, Wang Y, van Loveren H, et al. Severity of controlled cortical impact traumatic brain injury in rats and mice dictates degree of behavioral deficits. *Brain Res.* 2009;1287:157-63. Epub 2009/07/04.
28. Bazarian JJ, Cernak I, Noble-Haesslein L, Potolicchio S, Temkin N. Long-term neurologic outcomes after traumatic brain injury. *J Head Trauma Rehabil.* 2009;24(6):439-51. Epub 2009/11/27.
29. Parikh S, Koch M, Narayan RK. Traumatic brain injury. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(3):119-35. Epub 2007/07/12.
30. Adams JH, Graham DI, Gennarelli TA. Head injury in man and experimental animals: neuropathology. *Acta Neurochir Suppl (Wien).* 1983;32:15-30. Epub 1983/01/01.
31. Schmidt OI, Heyde CE, Ertel W, Stahel PF. Closed head injury--an inflammatory disease? *Brain Res Brain Res Rev.* 2005;48(2):388-99. Epub 2005/04/27.
32. Fluiter K, Opperhuizen AL, Morgan BP, Baas F, Ramaglia V. Inhibition of the membrane attack complex of the complement system reduces secondary neuroaxonal loss and promotes neurologic recovery after traumatic brain injury in mice. *J Immunol.* 2014;192(5):2339-48. Epub 2014/02/04.
33. Bellander BM, Singhrao SK, Ohlsson M, Mattsson P, Svensson M. Complement activation in the human brain after traumatic head injury. *J Neurotrauma.* 2001;18(12):1295-311. Epub 2002/01/10.

34. Tajiri N, Hernandez D, Acosta S, Shinozuka K, Ishikawa H, Ehrhart J, et al. Suppressed cytokine expression immediately following traumatic brain injury in neonatal rats indicates an expeditious endogenous anti-inflammatory response. *Brain Res.* 2014;1559:65-71. Epub 2014/03/08.
35. Kumar A, Loane DJ. Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention. *Brain Behav Immun.* 2012;26(8):1191-201. Epub 2012/06/26.
36. Kabadi SV, Faden AI. Neuroprotective strategies for traumatic brain injury: improving clinical translation. *Int J Mol Sci.* 2014;15(1):1216-36. Epub 2014/01/22.
37. Ohnishi M, Katsuki H, Fukutomi C, Takahashi M, Motomura M, Fukunaga M, et al. HMGB1 inhibitor glycyrrhizin attenuates intracerebral hemorrhage-induced injury in rats. *Neuropharmacology.* 2011;61(5-6):975-80. Epub 2011/07/15.
38. Taylor RA, Sansing LH. Microglial responses after ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:746068. Epub 2013/11/14.
39. Teng W, Wang L, Xue W, Guan C. Activation of TLR4-mediated NFkappaB signaling in hemorrhagic brain in rats. *Mediators Inflamm.* 2009;2009:473276. Epub 2010/02/13.
40. Lin S, Yin Q, Zhong Q, Lv FL, Zhou Y, Li JQ, et al. Heme activates TLR4-mediated inflammatory injury via MyD88/TRIF signaling pathway in intracerebral hemorrhage. *J Neuroinflammation.* 2012;9:46. Epub 2012/03/08.
41. Loftspring MC, Hansen C, Clark JF. A novel brain injury mechanism after intracerebral hemorrhage: the interaction between heme products and the immune system. *Med Hypotheses.* 2010;74(1):63-6.
42. Fujimoto S, Katsuki H, Ohnishi M, Takagi M, Kume T, Akaike A. Thrombin induces striatal neurotoxicity depending on mitogen-activated protein kinase pathways in vivo. *Neuroscience.* 2007;144(2):694-701. Epub 2006/11/07.
43. Ohnishi M, Katsuki H, Fujimoto S, Takagi M, Kume T, Akaike A. Involvement of thrombin and mitogen-activated protein kinase pathways in hemorrhagic brain injury. *Exp Neurol.* 2007;206(1):43-52. Epub 2007/05/15.
44. Liao B, Zhao W, Beers DR, Henkel JS, Appel SH. Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Exp Neurol.* 2012;237(1):147-52. Epub 2012/06/28.

45. Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, Hirano K, Uchimura K, Sakamoto K, et al. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death Dis.* 2013;4:e525. Epub 2013/03/09.
46. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med.* 2011;17(7):796-808. Epub 2011/07/09.
47. Brea D, Sobrino T, Ramos-Cabrer P, Castillo J. Inflammatory and neuroimmunomodulatory changes in acute cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis.* 2009;27 Suppl 1:48-64. Epub 2009/04/15.
48. Wang J, Dore S. Inflammation after intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007;27(5):894-908. Epub 2006/10/13.
49. Xi G, Keep RF, Hoff JT. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. *The Lancet Neurology.* 2006;5(1):53-63.
50. Aronowski J, Zhao X. Molecular pathophysiology of cerebral hemorrhage: secondary brain injury. *Stroke.* 2011;42(6):1781-6. Epub 2011/04/30.
51. Starossom SC, Mascanfroni ID, Imitola J, Cao L, Raddassi K, Hernandez SF, et al. Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration. *Immunity.* 2012;37(2):249-63. Epub 2012/08/14.
52. Gao L, Lu Q, Huang LJ, Ruan LH, Yang JJ, Huang WL, et al. Transplanted neural stem cells modulate regulatory T, gammadelta T cells and corresponding cytokines after intracerebral hemorrhage in rats. *Int J Mol Sci.* 2014;15(3):4431-41. Epub 2014/03/19.
53. Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, Doerr H, Sommer C, Rivest S, et al. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med.* 2009;15(2):192-9. Epub 2009/01/27.
54. Tessier PA, Naccache PH, Clark-Lewis I, Gladue RP, Neote KS, McColl SR. Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha. *J Immunol.* 1997;159(7):3595-602. Epub 1997/10/08.
55. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood.* 1998;92(9):3007-17. Epub 1998/10/27.

56. Nguyen HX, O'Barr TJ, Anderson AJ. Polymorphonuclear leukocytes promote neurotoxicity through release of matrix metalloproteinases, reactive oxygen species, and TNF-alpha. *J Neurochem.* 2007;102(3):900-12. Epub 2007/06/15.
57. Han N, Ding SJ, Wu T, Zhu YL. Correlation of free radical level and apoptosis after intracerebral hemorrhage in rats. *Neurosci Bull.* 2008;24(6):351-8. Epub 2008/11/28.
58. Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol.* 1997;61(4):375-80. Epub 1997/04/01.
59. Wang J. Preclinical and clinical research on inflammation after intracerebral hemorrhage. *Prog Neurobiol.* 2010;92(4):463-77. Epub 2010/08/18.
60. Stern M, Savill J, Haslett C. Human monocyte-derived macrophage phagocytosis of senescent eosinophils undergoing apoptosis. Mediation by alpha v beta 3/CD36/thrombospondin recognition mechanism and lack of phlogistic response. *Am J Pathol.* 1996;149(3):911-21. Epub 1996/09/01.
61. Zhao Z, Alam S, Oppenheim RW, Prevette DM, Evenson A, Parsadanian A. Overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the CNS rescues motoneurons from programmed cell death and promotes their long-term survival following axotomy. *Exp Neurol.* 2004;190(2):356-72. Epub 2004/11/09.
62. MacLellan CL, Silasi G, Poon CC, Edmundson CL, Buist R, Peeling J, et al. Intracerebral hemorrhage models in rat: comparing collagenase to blood infusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28(3):516-25. Epub 2007/08/30.
63. Krafft PR, Rolland WB, Duris K, Lekic T, Campbell A, Tang J, et al. Modeling intracerebral hemorrhage in mice: injection of autologous blood or bacterial collagenase. *J Vis Exp.* 2012(67):e4289. Epub 2012/10/02.
64. Chen JQ, Zhang CC, Lu H, Wang W. Assessment of traumatic brain injury degree in animal model. *Asian Pac J Trop Med.* 2014;7(12):991-5. Epub 2014/12/07.
65. James ML, Warner DS, Laskowitz DT. Preclinical models of intracerebral hemorrhage: a translational perspective. *Neurocrit Care.* 2008;9(1):139-52. Epub 2007/12/07.
66. Shen H, Liu C, Zhang D, Yao X, Zhang K, Li H, et al. Role for RIP1 in mediating necroptosis in experimental intracerebral hemorrhage model both in vivo and in vitro. *Cell Death Dis.* 2017;8(3):e2641. Epub 2017/03/03.

67. Yao Q, Liu Q, Xu H, Wu Z, Zhou L, Gu Z, et al. Upregulated Expression of SSTR3 is Involved in Neuronal Apoptosis After Intracerebral Hemorrhage in Adult Rats. *Cell Mol Neurobiol.* 2017. Epub 2017/02/09.
68. Wu J, Sun L, Li H, Shen H, Zhai W, Yu Z, et al. Roles of programmed death protein 1/programmed death-ligand 1 in secondary brain injury after intracerebral hemorrhage in rats: selective modulation of microglia polarization to anti-inflammatory phenotype. *J Neuroinflammation.* 2017;14(1):36. Epub 2017/02/16.
69. Fan X, Mu L. The role of heme oxygenase-1 (HO-1) in the regulation of inflammatory reaction, neuronal cell proliferation and apoptosis in rats after intracerebral hemorrhage (ICH). *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2017;13:77-85. Epub 2017/01/18.
70. Shimizu T, Hishikawa T, Nishihiro S, Shinji Y, Takasugi Y, Haruma J, et al. NADH fluorescence imaging and the histological impact of cortical spreading depolarization during the acute phase of subarachnoid hemorrhage in rats. *J Neurosurg.* 2017:1-7. Epub 2017/01/28.
71. Bullock R, Mendelow AD, Teasdale GM, Graham DI. Intracranial haemorrhage induced at arterial pressure in the rat. Part 1: Description of technique, ICP changes and neuropathological findings. *Neurol Res.* 1984;6(4):184-8. Epub 1984/12/01.
72. Yang GY, Betz AL, Chenevert TL, Brunberg JA, Hoff JT. Experimental intracerebral hemorrhage: relationship between brain edema, blood flow, and blood-brain barrier permeability in rats. *J Neurosurg.* 1994;81(1):93-102. Epub 1994/07/01.
73. Belayev L, Saul I, Curbelo K, Busto R, Belayev A, Zhang Y, et al. Experimental intracerebral hemorrhage in the mouse: histological, behavioral, and hemodynamic characterization of a double-injection model. *Stroke.* 2003;34(9):2221-7. Epub 2003/08/16.
74. Lighthall JW, Dixon CE, Anderson TE. Experimental models of brain injury. *J Neurotrauma.* 1989;6(2):83-97. Epub 1989/01/01.
75. Lighthall JW. Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *J Neurotrauma.* 1988;5(1):1-15. Epub 1988/01/01.
76. Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke.* 1990;21(5):801-7. Epub 1990/05/01.
77. Rosenberg GA, Estrada E, Wesley M, Kyner WT. Autoradiographic patterns of brain interstitial fluid flow after collagenase-induced haemorrhage in rat. *Acta Neurochir Suppl (Wien).* 1990;51:280-2. Epub 1990/01/01.

78. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition: Elsevier Science; 2006.
79. Yang F, Fu H, Lu YF, Wang XL, Yang Y, Yang F, et al. Post-stroke pain hypersensitivity induced by experimental thalamic hemorrhage in rats is region-specific and demonstrates limited efficacy of gabapentin. *Neurosci Bull.* 2014;30(6):887-902. Epub 2014/11/06.
80. Phymep - Preclinical research [En ligne]. Paris: Phymep; 2014. Cadre stéréotaxique ultra précis petits animaux – 10µm [cité le 18 déc 2017]; [environ 2 écrans]. Disponible: <http://www.phymep.com/produit/cadre-stereotaxique-ultra-precis-petits-animaux-10m/>
81. Janoff A, Zeligs JD. Vascular injury and lysis of basement membrane in vitro by neutral protease of human leukocytes. *Science.* 1968;161(3842):702-4. Epub 1968/08/16.
82. Priorities for clinical research in intracerebral hemorrhage: report from a National Institute of Neurological Disorders and Stroke workshop. *Stroke.* 2005;36(3):e23-41. Epub 2005/02/05.
83. Enzmann DR, Britt RH, Lyons BE, Buxton JL, Wilson DA. Natural history of experimental intracerebral hemorrhage: sonography, computed tomography and neuropathology. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1981;2(6):517-26. Epub 1981/11/01.
84. Lema PP, Girard C, Vachon P. Evaluation of dexamethasone for the treatment of intracerebral hemorrhage using a collagenase-induced intracerebral hematoma model in rats. *J Vet Pharmacol Ther.* 2004;27(5):321-8. Epub 2004/10/27.
85. Lema PP, Girard C, Vachon P. High doses of methylprednisolone are required for the treatment of collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Can J Vet Res.* 2005;69(4):253-9. Epub 2006/02/17.
86. Savard C, Lema PP, Helie P, Vachon P. Effects of timing of dexamethasone treatment on the outcome of collagenase-induced intracerebral hematoma in rats. *Comp Med.* 2009;59(5):444-8. Epub 2009/11/06.
87. Fujii Y, Tanaka R, Takeuchi S, Koike T, Minakawa T, Sasaki O. Hematoma enlargement in spontaneous intracerebral hemorrhage. *J Neurosurg.* 1994;80(1):51-7. Epub 1994/01/01.
88. Kawai N, Nakamura T, Nagao S. Early hemostatic therapy using recombinant factor VIIa in a collagenase-induced intracerebral hemorrhage model in rats. *Acta Neurochir Suppl.* 2006;96:212-7. Epub 2006/05/05.

89. MacLellan CL, Girgis J, Colbourne F. Delayed onset of prolonged hypothermia improves outcome after intracerebral hemorrhage in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004;24(4):432-40. Epub 2004/04/17.
90. MacLellan CL, Auriat AM, McGie SC, Yan RH, Huynh HD, De Butte MF, et al. Gauging recovery after hemorrhagic stroke in rats: implications for cytoprotection studies. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26(8):1031-42. Epub 2006/01/06.
91. Hartman R, Lekic T, Rojas H, Tang J, Zhang JH. Assessing functional outcomes following intracerebral hemorrhage in rats. *Brain Res.* 2009;1280:148-57. Epub 2009/05/26.
92. Chesney JA, Kondoh T, Conrad JA, Low WC. Collagenase-induced intrastriatal hemorrhage in rats results in long-term locomotor deficits. *Stroke.* 1995;26(2):312-6; discussion 7. Epub 1995/02/01.
93. Balami JS, Buchan AM. Complications of intracerebral haemorrhage. *Lancet Neurol.* 2012;11(1):101-18. Epub 2011/12/17.
94. Klahr AC, Dickson CT, Colbourne F. Seizure activity occurs in the collagenase but not the blood infusion model of striatal hemorrhagic stroke in rats. *Transl Stroke Res.* 2015;6(1):29-38. Epub 2014/07/24.
95. Tupper DE, Wallace RB. Utility of the neurological examination in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 1980;40(6):999-1003. Epub 1980/01/01.
96. Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia.* 1968;13(3):222-57. Epub 1968/09/20.
97. Vachon P, Ste-Marie L, Montgomery J. Predictive value of a battery of behavioural tests to determine the extent of induced cerebral ischemia by cauterisation of the middle cerebral artery. *Sciences et Techniques des Animaux de Laboratoire.* 1999;24(3):171-7.
98. Mouzon B, Chaytow H, Crynen G, Bachmeier C, Stewart J, Mullan M, et al. Repetitive mild traumatic brain injury in a mouse model produces learning and memory deficits accompanied by histological changes. *J Neurotrauma.* 2012;29(18):2761-73. Epub 2012/08/21.
99. Crawley JN. Motor functions. *What's wrong with my mouse? : behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice.* 2e éd. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience; 2007. p. 62-85.

100. Schallert T, Woodlee MT, Fleming SM. Disentangling multiple types of recovery from brain injury. Dans: Kriegelstein J, Klumpp S, rédacteurs. *Pharmacology of Cerebral Ischemia*. Austin: Institute for Neuroscience UT; 2001. p. 201-15.
101. Williams E. Nursing perspective on pain management. Dans: Vadivelu N, Urman RD, Hines RL, rédacteurs. *Essentials of Pain Management*. [ressource électronique]. New York, NY: Springer New York; 2011. [cité le 2015/05/16]. Disponible: <http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-87579-8>
102. Frenette L. The acute pain service. *Crit Care Clin*. 1999;15(1):143-50. Epub 1999/02/04.
103. Drolet P. Approche et traitement de la douleur aiguë. Dans: Beaulieu P, rédacteur. *Pharmacologie de la douleur*. Montréal: Presses de l'Université de Montréal; 2005. p. 381-404.
104. Grant D. *Pain management in small animals*. New York: Butterworth-Heinemann/Elsevier; 2006.
105. Formisano R, Bivona U, Catani S, D'Ippolito M, Buzzi MG. Post-traumatic headache: facts and doubts. *J Headache Pain*. 2009;10(3):145-52. Epub 2009/03/19.
106. Fioravanti M, Ramelli L, Napoleoni A, Lazzari R, Ruggieri S, Cerbo R, et al. Post-traumatic headache: neuropsychological and clinical aspects. *Cephalalgia*. 1983;3 Suppl 1:221-4. Epub 1983/08/01.
107. Evans RW. Post-traumatic headaches. *Neurol Clin*. 2004;22(1):237-49, viii. Epub 2004/04/06.
108. Gregory NG. *Physiology and behaviour of animal suffering*. Oxford, UK: Blackwell Science; 2004.
109. Ray BS, Wolff HG. Experimental studies on headache: Pain-sensitive structures of the head and their significance in headache. *Arch Surg*. 1940;41(4):813-56.
110. Arboix A, Massons J, Oliveres M, Arribas MP, Titus F. Headache in acute cerebrovascular disease: a prospective clinical study in 240 patients. *Cephalalgia*. 1994;14(1):37-40. Epub 1994/02/01.
111. Carolei A, Sacco S. Headache attributed to stroke, TIA, intracerebral haemorrhage, or vascular malformation. *Handb Clin Neurol*. 2010;97:517-28. Epub 2010/09/08.

112. Mohr JP, Caplan LR, Melski JW, Goldstein RJ, Duncan GW, Kistler JP, et al. The Harvard Cooperative Stroke Registry: a prospective registry. *Neurology*. 1978;28(8):754-62. Epub 1978/08/01.
113. Burstein R, Goor-Aryeh I, Jakubowski M. Sensitization of trigeminovascular neurons and migraine therapy with triptans. Dans: Villanueva L, Dickenson AH, Ollat H, rédacteurs. *The Pain System in Normal and Pathological States: A Primer for Clinicians*. Seattle: IASP Press; 2004. p. 211-22.
114. Melo TP, Pinto AN, Ferro JM. Headache in intracerebral hematomas. *Neurology*. 1996;47(2):494-500. Epub 1996/08/01.
115. Ebersberger A, Averbeck B, Messlinger K, Reeh PW. Release of substance P, calcitonin gene-related peptide and prostaglandin E2 from rat dura mater encephali following electrical and chemical stimulation in vitro. *Neuroscience*. 1999;89(3):901-7. Epub 1999/04/13.
116. Goadsby PJ, Edvinsson L. The trigeminovascular system and migraine: studies characterizing cerebrovascular and neuropeptide changes seen in humans and cats. *Ann Neurol*. 1993;33(1):48-56. Epub 1993/01/01.
117. Moskowitz MA, Macfarlane R. Neurovascular and molecular mechanisms in migraine headaches. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1993;5(3):159-77. Epub 1993/01/01.
118. Strassman AM, Raymond SA, Burstein R. Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches. *Nature*. 1996;384(6609):560-4. Epub 1996/12/12.
119. Daniel BT. Online Migraine Doctor [En ligne]. USA: Britt Talley Daniel; 2013. How to tell migraine from other types of headache [cité le 10 déc 2016]; [environ 7 écrans]. Disponible: <http://www.doctormigraine.com/how-to-tell-migraine-from-other-types-of-headache/>
120. Ebersberger A, Ringkamp M, Reeh PW, Handwerker HO. Recordings from brain stem neurons responding to chemical stimulation of the subarachnoid space. *J Neurophysiol*. 1997;77(6):3122-33. Epub 1997/06/01.
121. Schepelmann K, Ebersberger A, Pawlak M, Oppmann M, Messlinger K. Response properties of trigeminal brain stem neurons with input from dura mater encephali in the rat. *Neuroscience*. 1999;90(2):543-54. Epub 1999/04/24.
122. Burstein R, Yamamura H, Malick A, Strassman AM. Chemical stimulation of the intracranial dura induces enhanced responses to facial stimulation in brain stem trigeminal neurons. *J Neurophysiol*. 1998;79(2):964-82. Epub 1998/04/18.

123. Burstein R, Jakubowski M. Analgesic triptan action in an animal model of intracranial pain: a race against the development of central sensitization. *Ann Neurol.* 2004;55(1):27-36. Epub 2004/01/06.
124. Matsumiya LC, Sorge RE, Sotocinal SG, Tabaka JM, Wieskopf JS, Zaloum A, et al. Using the Mouse Grimace Scale to reevaluate the efficacy of postoperative analgesics in laboratory mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2012;51(1):42-9. Epub 2012/02/15.
125. Héon H. Les modèles animaux de douleur. Dans: Beaulieu P, rédacteur. *Pharmacologie de la douleur.* Montréal: Presses de l'Université de Montréal; 2005. p. 283-322.
126. Mogil JS, Cragger SE. What should we be measuring in behavioral studies of chronic pain in animals? *Pain.* 2004;112(1-2):12-5. Epub 2004/10/21.
127. Roberts LH. The rodent ultrasound production mechanism. *Ultrasonics.* 1975;13(2):83-8. Epub 1975/03/01.
128. Knutson B, Burgdorf J, Panksepp J. Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. *Psychol Bull.* 2002;128(6):961-77. Epub 2002/10/31.
129. Blumberg MS, Sokoloff G. Do infant rats cry? *Psychol Rev.* 2001;108(1):83-95. Epub 2001/02/24.
130. Poel AMvd, Miczek KA. Long Ultrasonic Calls in Male Rats following Mating, Defeat and Aversive Stimulation: Frequency Modulation and Bout Structure. *Behaviour.* 1991;119(1/2):127-42.
131. Portfors CV. Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2007;46(1):28-34. Epub 2007/01/06.
132. Darwin C. *The Expression of the Emotions in Man and Animals* by Charles Darwin. London: John Murray; 1872.
133. *Emotion in the human face.* 2e éd. Ekman P, rédacteur. Cambridge Cambridgeshire: Cambridge University Press; 1982.
134. Prkachin KM. The consistency of facial expressions of pain: a comparison across modalities. *Pain.* 1992;51(3):297-306. Epub 1992/12/01.
135. Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods.* 2010;7(6):447-9. Epub 2010/05/11.

136. Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, et al. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain*. 2011;7:55. Epub 2011/08/02.
137. Oliver V, De Rantere D, Ritchie R, Chisholm J, Hecker KG, Pang DS. Psychometric assessment of the Rat Grimace Scale and development of an analgesic intervention score. *PLoS One*. 2014;9(5):e97882. Epub 2014/05/20.
138. Ng I, Lim J, Wong HB. Effects of head posture on cerebral hemodynamics: its influences on intracranial pressure, cerebral perfusion pressure, and cerebral oxygenation. *Neurosurgery*. 2004;54(3):593-7; discussion 8. Epub 2004/03/19.
139. Yang SY, Zhang S, Wang ML. Clinical significance of admission hyperglycemia and factors related to it in patients with acute severe head injury. *Surg Neurol*. 1995;44(4):373-7. Epub 1995/10/01.
140. Syring RS, Otto CM, Drobotz KJ. Hyperglycemia in dogs and cats with head trauma: 122 cases (1997-1999). *J Am Vet Med Assoc*. 2001;218(7):1124-9. Epub 2001/04/25.
141. Jeremitsky E, Omert LA, Dunham CM, Wilberger J, Rodriguez A. The impact of hyperglycemia on patients with severe brain injury. *J Trauma*. 2005;58(1):47-50. Epub 2005/01/28.
142. Graffagnino C, Gurram AR, Kolls B, Olson DM. Intensive insulin therapy in the neurocritical care setting is associated with poor clinical outcomes. *Neurocrit Care*. 2010;13(3):307-12. Epub 2010/11/19.
143. Kramer AH, Roberts DJ, Zygun DA. Optimal glycemic control in neurocritical care patients: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*. 2012;16(5):R203. Epub 2012/10/23.
144. Marion DW, Penrod LE, Kelsey SF, Obrist WD, Kochanek PM, Palmer AM, et al. Treatment of traumatic brain injury with moderate hypothermia. *N Engl J Med*. 1997;336(8):540-6. Epub 1997/02/20.
145. Hayes GM. Severe seizures associated with traumatic brain injury managed by controlled hypothermia, pharmacologic coma, and mechanical ventilation in a dog. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2009;19(6):629-34. Epub 2009/12/19.
146. Kirkpatrick AW, Chun R, Brown R, Simons RK. Hypothermia and the trauma patient. *Can J Surg*. 1999;42(5):333-43. Epub 1999/10/20.

147. Schubert A. Side effects of mild hypothermia. *J Neurosurg Anesthesiol.* 1995;7(2):139-47. Epub 1995/04/01.
148. Teitelbaum JS, Ayoub O, Skrobik Y. A critical appraisal of sedation, analgesia and delirium in neurocritical care. *Can J Neurol Sci.* 2011;38(6):815-25. Epub 2011/10/28.
149. Kehlet H, Dahl JB. Anaesthesia, surgery, and challenges in postoperative recovery. *Lancet.* 2003;362(9399):1921-8. Epub 2003/12/12.
150. Lauer KK, Connolly LA, Schmeling WT. Opioid sedation does not alter intracranial pressure in head injured patients. *Can J Anaesth.* 1997;44(9):929-33. Epub 1997/09/26.
151. Armitage-Chan EA, Wetmore LA, Chan DL. Anesthetic management of the head trauma patient. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care.* 2007;17(1):5-14.
152. Deschamps J-Y. Vade-mecum de gestion de la douleur chez le chien et le chat. 2e éd. Paris: Med'com; 2010.
153. Chauvin M, Beaulieu P. Pharmacologie des opioïdes. Dans: Beaulieu P, rédacteur. *Pharmacologie de la douleur.* Montréal, QC, CAN: Les Presses de l'Université de Montréal; 2005. p. 39-77.
154. Carnes MB, Macintire DK, Saxon WD. Neurologic emergencies. Dans: Macintire DK, Drobatz KJ, Haskins SC, Saxon WD, rédacteurs. *Manual of Small Animal Emergency and Critical Care Medicine.* Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell; 2012. [cité le 2015/05/14]. Disponible: <http://site.ebrary.com/lib/umontreal/detail.action?docID=10565126>
155. Del Bigio MR, Yan HJ, Buist R, Peeling J. Experimental intracerebral hemorrhage in rats. Magnetic resonance imaging and histopathological correlates. *Stroke.* 1996;27(12):2312-9; discussion 9-20. Epub 1996/12/01.
156. Leung V, Zhang E, Pang DS. Real-time application of the Rat Grimace Scale as a welfare refinement in laboratory rats. *Sci Rep.* 2016;6:31667. Epub 2016/08/18.
157. Waite ME, Tomkovich A, Quinn TL, Schumann AP, Dewberry LS, Totsch SK, et al. Efficacy of Common Analgesics for Postsurgical Pain in Rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2015;54(4):420-5. Epub 2015/08/01.
158. De Rantere D, Schuster CJ, Reimer JN, Pang DS. The relationship between the Rat Grimace Scale and mechanical hypersensitivity testing in three experimental pain models. *Eur J Pain.* 2016;20(3):417-26. Epub 2015/07/02.

159. van den Hoogen RH, Colpaert FC. Epidural and subcutaneous morphine, meperidine (pethidine), fentanyl and sufentanil in the rat: analgesia and other in vivo pharmacologic effects. *Anesthesiology*. 1987;66(2):186-94. Epub 1987/02/01.
160. Christensen H, Hermann M. Immunological response as a source to variability in drug metabolism and transport. *Front Pharmacol*. 2012;3:8. Epub 2012/03/01.
161. Keep RF, Xiang J, Ennis SR, Andjelkovic A, Hua Y, Xi G, et al. Blood-brain barrier function in intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl*. 2008;105:73-7. Epub 2008/12/11.
162. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*. 2005;57(2):173-85. Epub 2005/05/26.
163. Ronaldson PT, Davis TP. Targeting blood-brain barrier changes during inflammatory pain: an opportunity for optimizing CNS drug delivery. *Ther Deliv*. 2011;2(8):1015-41. Epub 2012/04/03.
164. Witt KA, Davis TP. CNS drug delivery: opioid peptides and the blood-brain barrier. *Aaps j*. 2006;8(1):E76-88. Epub 2006/04/06.
165. Lo EH, Singhal AB, Torchilin VP, Abbott NJ. Drug delivery to damaged brain. *Brain Res Brain Res Rev*. 2001;38(1-2):140-8. Epub 2001/12/26.
166. Rosenberg GA, Estrada E, Kelley RO, Kornfeld M. Bacterial collagenase disrupts extracellular matrix and opens blood-brain barrier in rat. *Neurosci Lett*. 1993;160(1):117-9. Epub 1993/09/17.
167. Goldstein JN, Fazen LE, Snider R, Schwab K, Greenberg SM, Smith EE, et al. Contrast extravasation on CT angiography predicts hematoma expansion in intracerebral hemorrhage. *Neurology*. 2007;68(12):889-94. Epub 2007/03/21.
168. Shlosberg D, Benifla M, Kaufer D, Friedman A. Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol*. 2010;6(7):393-403. Epub 2010/06/17.
169. Statler KD, Alexander H, Vagni V, Dixon CE, Clark RS, Jenkins L, et al. Comparison of seven anesthetic agents on outcome after experimental traumatic brain injury in adult, male rats. *J Neurotrauma*. 2006;23(1):97-108. Epub 2006/01/25.

170. Lekic T, Rolland W, Hartman R, Kamper J, Suzuki H, Tang J, et al. Characterization of the brain injury, neurobehavioral profiles, and histopathology in a rat model of cerebellar hemorrhage. *Exp Neurol*. 2011;227(1):96-103. Epub 2010/10/05.
171. Clark JD, Shi X, Li X, Qiao Y, Liang D, Angst MS, et al. Morphine reduces local cytokine expression and neutrophil infiltration after incision. *Mol Pain*. 2007;3:28. Epub 2007/10/03.
172. Martin JL, Koodie L, Krishnan AG, Charboneau R, Barke RA, Roy S. Chronic morphine administration delays wound healing by inhibiting immune cell recruitment to the wound site. *Am J Pathol*. 2010;176(2):786-99. Epub 2010/01/01.
173. Niu L, Cao B, Zhu H, Mei B, Wang M, Yang Y, et al. Impaired in vivo synaptic plasticity in dentate gyrus and spatial memory in juvenile rats induced by prenatal morphine exposure. *Hippocampus*. 2009;19(7):649-57. Epub 2008/12/31.
174. Charles River [En ligne]. USA: Chales River Laboratoires International Inc.; 2016. CD® IGS Rat [cité le 21 Nov 2016]; [environ 4 écrans]. Disponible: <http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/cd-igs-rat>
175. Morley JE, Levine AS, Gosnell BA, Billington CJ. Which opioid receptor mechanism modulates feeding? *Appetite*. 1984;5(1):61-8. Epub 1984/03/01.
176. Ghossoub M, Nataf F, Merienne L, Devaux B, Turak B, Roux FX. [Characteristics of headache associated with cerebral arteriovenous malformations]. *Neurochirurgie*. 2001;47(2-3 Pt 2):177-83. Epub 2001/06/16. Caracteristiques des cepheales associees aux malformations arterio-veineuses cerebrales.
177. Magis D, Sava S, d'Elia TS, Baschi R, Schoenen J. Safety and patients' satisfaction of transcutaneous supraorbital neurostimulation (tSNS) with the Cefaly(R) device in headache treatment: a survey of 2,313 headache sufferers in the general population. *J Headache Pain*. 2013;14:95. Epub 2013/12/03.
178. Kirkman MA, Allan SM, Parry-Jones AR. Experimental intracerebral hemorrhage: avoiding pitfalls in translational research. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011;31(11):2135-51. Epub 2011/08/25.
179. Strom JO, Theodorsson A, Theodorsson E. Mechanisms of estrogens' dose-dependent neuroprotective and neurodamaging effects in experimental models of cerebral ischemia. *Int J Mol Sci*. 2011;12(3):1533-62. Epub 2011/06/16.

180. Nakamura T, Xi G, Hua Y, Schallert T, Hoff JT, Keep RF. Intracerebral hemorrhage in mice: model characterization and application for genetically modified mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004;24(5):487-94. Epub 2004/05/07.
181. Roof RL, Duvdevani R, Stein DG. Gender influences outcome of brain injury: progesterone plays a protective role. *Brain Res.* 1993;607(1-2):333-6. Epub 1993/04/02.
182. Daverat P, Castel JP, Dartigues JF, Orgogozo JM. Death and functional outcome after spontaneous intracerebral hemorrhage. A prospective study of 166 cases using multivariate analysis. *Stroke.* 1991;22(1):1-6. Epub 1991/01/01.
183. Wasserman JK, Yang H, Schlichter LC. Glial responses, neuron death and lesion resolution after intracerebral hemorrhage in young vs. aged rats. *Eur J Neurosci.* 2008;28(7):1316-28. Epub 2008/11/01.
184. Gong Y, Hua Y, Keep RF, Hoff JT, Xi G. Intracerebral hemorrhage: effects of aging on brain edema and neurological deficits. *Stroke.* 2004;35(11):2571-5. Epub 2004/10/09.
185. Radabaugh HL, Carlson LJ, O'Neil DA, LaPorte MJ, Monaco CM, Cheng JP, et al. Abbreviated environmental enrichment confers neurobehavioral, cognitive, and histological benefits in brain-injured female rats. *Exp Neurol.* 2016;286:61-8. Epub 2016/10/23.
186. Engelhard K, Werner C, Eberspacher E, Bachl M, Blobner M, Hildt E, et al. The effect of the alpha 2-agonist dexmedetomidine and the N-methyl-D-aspartate antagonist S(+)-ketamine on the expression of apoptosis-regulating proteins after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Anesth Analg.* 2003;96(2):524-31, table of contents. Epub 2003/01/23.
187. Attal N, Brasseur L, Parker F, Chauvin M, Bouhassira D. Effects of gabapentin on the different components of peripheral and central neuropathic pain syndromes: a pilot study. *Eur Neurol.* 1998;40(4):191-200. Epub 1998/11/14.
188. Castel A, Vachon P. Gabapentin reverses central pain sensitization following a collagenase-induced intrathalamic hemorrhage in rats. *J Pain Res.* 2013;7:5-12. Epub 2013/12/26.
189. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc.* 2006;1(2):848-58. Epub 2007/04/05.
190. Barth KN, Onesti ST, Krauss WE, Solomon RA. A simple and reliable technique to monitor intracranial pressure in the rat: technical note. *Neurosurgery.* 1992;30(1):138-40. Epub 1992/01/01.