

Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Louis Pasteur
Strasbourg I

Discipline:
Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité:
Neurosciences

par Emmanuel Raffo

**Métabolisme énergétique cérébral et épilepsie:
maturation du métabolisme glucidique et propriétés
anti-épileptiques et anti-épileptogènes d'un régime cétogène.**

Soutenue publiquement le 16 novembre 2007

Membres du jury

Directeur de Thèse :	Dr Astrid Nehlig,	Strasbourg
Rapporteur Interne :	Pr Guy Sandner,	Strasbourg
Rapporteur Externe :	Pr Louis Vallée,	Lille
Rapporteur Externe :	Dr Fabrice Wallois,	Amiens
Examineur :	Pr Jacques Motte,	Reims
Examineur :	Pr Pierre Monin,	Nancy

Qu'il me soit permis de remercier Monsieur le Professeur Guy Sandner, Monsieur le Professeur Louis Vallée et Monsieur le Docteur Fabrice Wallois pour l'honneur qu'ils me font d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Merci également à Monsieur le Professeur Jacques Motte et Monsieur le Professeur Pierre Monin qui ont accepté de juger ce travail, pour leur soutien au cours de sa réalisation et également dans ma vie professionnelle.

Merci particulièrement à Madame le Docteur Astrid Nehlig qui m'accueilli dans son équipe, m'a accompagné dans la découverte de l'univers de la recherche, et m'a soutenu pour la réalisation de ce travail. J'aimerais saluer sa constante disponibilité, sa rigueur bienveillante dans le travail, la qualité de son encadrement. Au delà, je souhaite lui manifester ma gratitude pour les précieux conseils lors des choix plus personnels, et l'assurer de ma respectueuse amitié.

Merci à Marie, parce que $e^{i\pi} = -1$.

Merci à mes enfants, Quentin, Mathilde, Madeleine.

Merci à mes parents, à ma sœur Céline, à ma belle-famille Annie, Serge, Valérie, Olivier et leurs enfants.

Merci à Roxane, Emmanuel et leurs enfants, pour notre amitié si précieuse.

Merci à Dominique, pour l'amitié épistolaire.

Merci à Catherine, pour l'amitié au quotidien.

Merci à Marie-Laure, pour l'amitié indéfectible.

Merci à toutes les personnes rencontrées au sein des unités INSERM 398, 405, 666.

En particulier, merci à Estelle, Arielle et Jennifer: pour l'aide dans le travail, le soutien moral, la bonne humeur ... et les stages d'autonomie.

Liste des publications et communications de l'auteur en rapport avec son travail de thèse:

Publications

1. Raffo E, Koning E, Nehlig A. Postnatal maturation of cytochrome oxidase and lactate dehydrogenase activity and age-dependent consequences of Lithium-Pilocarpine status epilepticus in the rat: a regional histoenzymology study. *Pediatr Res* 2004;56:647-655.
2. Raffo E, Linard B, Ferrandon A, Koning E, Nehlig A. Ketogenic diet exhibits neuroprotective effects in the hippocampus but lacks to inhibit epileptogenesis in the lithium-lilocarpine epilepsy model. *Article en préparation pour Epilepsia*
3. Raffo E, François J, Ferrandon A, Koning E, Nehlig A. Calorie-restricted ketogenic diet increases thresholds to all patterns of pentylènetetrazole-induced seizures: critical importance of electroclinical assessment. *Epilepsia* 2007 – article sous presse.

Communications orales :

Raffo E, Koning E, Nehlig A. Maturation du métabolisme énergétique cérébral: étude de la cytochrome oxydase (CO) et de la lactate déshydrogénase (LDH). Société Française de Recherche en Pédiatrie. Nancy, 2003.

Raffo E, Koning E, Nehlig A. Métabolisme énergétique cérébral et épilepsie : étude de la lactate déshydrogénase et de la cytochrome oxydase à la phase silencieuse du modèle d'épilepsie induite par Lithium-Pilocarpine chez le rat. Société Française de Neurologie Pédiatrique. Caen, 2003

Communications affichées:

Raffo E, Koning E, Nehlig A. Crises épileptiques induites par PTZ IV chez le rat: Effet protecteur d'un régime cétoène versus hypocalorique. Société Française de Neurologie Pédiatrique. Strasbourg. 2006

Raffo E, François J, Ferrandon A, Koning E, Nehlig A. Calorie-restricted ketogenic diet increases thresholds to all patterns of pentylènetetrazole-induced seizures: critical importance of electroclinical assessment. American Epilepsy Society, Philadelphie. Décembre 2007 - accepté

Abbreviations

Acétyl-CoA	Acétyl-Coenzyme A
ANLSH	"Astrocyte Neuron Lactate Shuttle Hypothesis"
ATP	Adénosine Triphosphate
CA	Corne d'Ammon
CO	Cytochrome Oxydase
CAT	Cycle des Acides Tricarboxyliques
EEG	Electroencéphalogramme
FAD/FADH2	Flavine Adénine Dinucléotide
GLUT	Transporteur transmembranaire du glucose
HC	Régime glucidique hypocalorique (Hypocalorie Carbohydate)
HK	Régime cétogène hypocalorique (Hypocalorie Ketogenic)
LDH	Lactate Déshydrogénase
MCT	Transporteur d'acide monocarboxylique
NAD/NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NC	Régime glucidique normocalorique (Normocalorie Carbohydate)
NK	Régime cétogène normocalorique (Normocalorie Ketogenic)
Pn	Age post natal en jours (le premier jour de vie étant P0)
PTZ	Pentylènetetrazole
UCLG	Utilisation Cérébrale Locale de Glucose

Table des matières

<i>Abbreviations</i>	_____	
<i>Table des matières</i>	_____	
<i>Table des illustrations</i>	_____	
<i>Avant-propos</i>	_____	1
<i>Première section : Introduction</i>	_____	3
1.1. Voies métaboliques du glucose et métabolisme énergétique	_____	3
1.1.1. Voies métaboliques du glucose	_____	3
1.1.2. Fournisseurs non glucidiques d'acétyl-CoA	_____	5
1.1.3. Transporteurs transmembranaires	_____	6
1.1.4. Dynamique du métabolisme énergétique cérébral chez l'animal adulte	_____	9
1.1.5. Particularités du métabolisme énergétique cérébral de l'animal en développement	_____	13
1.1.6. Métabolisme du glucose et épilepsies	_____	15
1.2. Régime cétogène	_____	17
1.2.1. Aspects cliniques	_____	17
1.2.2. Régime cétogène: données expérimentales chez l'animal	_____	17
1.2.3. Mécanismes d'action du régime cétogène	_____	18
1.3. Modèles animaux utilisés	_____	19
1.3.1. Le modèle Lithium-Pilocarpine chez le rat	_____	19
1.3.2. Le modèle de crises induites par le Pentylènetetrazole chez le rat	_____	23
1.4. Objectifs	_____	24
1.4.1. Métabolisme énergétique, maturation et épiléptogénèse	_____	24
1.4.2. Métabolisme énergétique et crise d'épilepsie : effet anti-épileptogène du régime cétogène?	_____	25
<i>Deuxième section : protocoles expérimentaux</i>	_____	26
2.1. Animaux	_____	26
2.1.1. Provenance – reproduction	_____	26
2.1.2. Régimes alimentaires	_____	26
2.2. Modèles animaux: protocole expérimentaux	_____	27
2.2.1. Le modèle Lithium-Pilocarpine	_____	27
2.2.2. <i>Modèle de crises induites par le pentylènetetrazole</i>	_____	28
2.3. Electroencéphalographie	_____	28
2.4. Détermination des taux sanguins de glucose et de β-hydroxybutyrate	_____	29

2.5. Histologie	29
2.6. Histo-enzymologie: lactate déshydrogénase et cytochrome oxydase	29
<i>Troisième section : Résultats expérimentaux</i>	32
3.1. Publication n°1 : Maturation des voies de glycolyse aéro et anaérobie au niveau cérébral	32
3.1.1. Profils de maturation de la CO et de la LDH	32
3.1.2. Discussion	36
3.1.3. Conclusion	37
3.2. Publication n°1 : Conséquences d'un état de mal épileptique précoce induit par Lithium-Pilocarpine sur la maturation du métabolisme énergétique cérébral	38
3.2.1. Résultats	38
3.2.2. Discussion	41
3.2.3. Conclusion	44
3.3. Publication n°2 – en préparation : Régime cétoène et neuroprotection dans le modèle Lithium-Pilocarpine	46
3.3.1. Résultats	46
3.3.2. Discussion	50
3.3.3. Conclusion	53
3.4. Publication n°3 : Propriétés anti-épileptiques du régime cétoène dans le modèle de crises induites par pentylènetétrazole	54
3.4.1. Résultats	54
3.4.2. Discussion	59
3.4.3. Conclusion	62
<i>Conclusions générales – Perspectives</i>	63
<i>Bibliographie</i>	67
<i>Publication 1</i>	80
<i>Publication 2</i>	90
<i>Publication 3</i>	91

Table des illustrations

Figure 1 : Voies du métabolisme énergétique du glucose	4
Figure 2 : Fournisseurs d'acétyl-CoA	5
Figure 3 : Métabolisme des composés cétoniques	6
Figure 4 : localisation cérébrale des transporteurs du glucose	7
Figure 5 : Transporteurs d'acides monocarboxyliques	8
Figure 6 : Compartimentation du métabolisme du glutamate	10
Figure 7 : Couplage métabolique astrocyte/neurone	13
Figure 8 : Maturation régionale de la cytochrome oxydase	33
Figure 9 : Profils de maturation de la cytochrome oxydase	34
Figure 10: Profils de maturation de la cytochrome oxydase	35
Figure 11: Conséquences de l'état de mal induit par Lithium-Pilocarpine sur l'activité cytochrome oxydase chez l'animal adulte	39
Figure 12 : Activité de la cytochrome oxydase dans l'hippocampe à la fin de la phase de latence	40
Figure 13 : Dommages neuronaux, activités cytochrome oxydase et lactate déshydrogénase dans le cortex entorhinal à la fin de la période de latence	42
Figure 14 : Activité régionale de la cytochrome oxydase à la fin de la période de latence	43
Figure 15 : Mortalité induite par l'état de mal	48
Figure 16 : Latence d'apparition de l'épilepsie	48
Figure 17 : Neuroprotection de l'hippocampe conférée par le régime cétogène	49
Figure 18 : Poids des animaux après trois semaines de régime	54
Figure 19 : Glycémie et taux de β -hydroxybutyrate sanguin après trois semaines de régime	55
Figure 20 : Caractéristiques EEG des crises induites par pentylènetétrazole intraveineux	56
Figure 21 : Seuils électroencéphalographiques des crises induites par pentylènetétrazole	57
Figure 22 : Seuils cliniques des crises induites par pentylènetétrazole	58
Figure 23 : Latence de la crise clonique après injection de pentylènetétrazole intraveineux	60

Avant-propos

Les épilepsies constituent le groupe de maladies neurologiques chroniques le plus fréquent après la migraine. La prévalence des épilepsies est de 5 à 10 ‰ habitants dans les pays industrialisés, l'incidence est supérieure à 44/100000 habitants/an. L'incidence la plus élevée concerne la population des enfants de moins de un an.

Les épilepsies sont définies par la récurrence spontanée de crises épileptiques. Ces crises sont secondaires à la décharge simultanée et hypersynchrone d'une population plus ou moins étendue de neurones, intéressant en partie au moins les structures corticales. La topographie de la décharge rend compte des caractéristiques cliniques des crises.

En dehors d'agressions externes, traumatiques, métaboliques, pharmacologiques ou hyperthermie chez l'enfant, aucune crise épileptique ne se développe spontanément dans le cerveau sain. Chez le patient épileptique, il existe une prédisposition aux crises. Cette prédisposition est sous-tendue par les propriétés modifiées de la membrane excitable neuronale, des altérations de l'équilibre entre la neurotransmission excitatrice et inhibitrice, et parfois des modifications anatomo-histologiques à l'origine de la création de néo-réseaux hyperexcitables. Au niveau cellulaire, ces modifications sont supportées par des altérations structurales ou métaboliques. Les voies du métabolisme énergétique sont en particulier impliquées d'une part du fait de l'augmentation considérable de la demande énergétique au niveau des structures impliquées précocement lors d'une crise, et d'autre part du fait des relations étroites entre les voies du métabolisme énergétique, principalement glucidique dans le cerveau adulte, et celles des acides aminés impliqués dans la neurotransmission.

Malgré le développement de nouvelles molécules indiquées pour le traitement des patients épileptiques, plusieurs problèmes de prise en charge subsistent. La proportion d'épilepsies pharmaco-résistantes a été peu modifiée par l'apparition de ces nouvelles thérapeutiques. Par ailleurs, les médicaments disponibles sont actifs comme anti-épileptiques, c'est-à-dire pour minimiser le risque de survenue de crises, mais n'empêchent pas les remaniements secondaires à la répétition des crises. Actuellement, on ne dispose pas de substance au réel potentiel anti-épileptogène.

Les conséquences des crises répétées sur le cerveau de l'enfant sont particulières. Bien que dans certains modèles animaux une vulnérabilité moindre aux agressions métaboliques,

ischémie et anoxie, ait été montrée, la survenue d'une crise épileptique prolongée précoce peut contribuer à induire une épilepsie chronique à l'âge adulte. D'autre part, dans la population pédiatrique, certaines épilepsies peuvent, même en l'absence de lésion cérébrale macroscopique identifiable, entraîner une dégradation cognitive majeure. Les encéphalopathies épileptiques se caractérisent par une désorganisation complète de l'activité électroencéphalographique même en dehors des crises. Cette désorganisation est le reflet de l'altération des mécanismes de neurotransmission au niveau des réseaux physiologiques.

L'étude et la compréhension des modifications du métabolisme qui favorisent l'épileptogénèse et les encéphalopathies épileptiques permettent d'envisager des stratégies thérapeutiques différentes des agents pharmacologiques usuels. En particulier, la modification des substrats métaboliques énergétiques est une voie d'investigation intéressante pour la prise en charge des patients épileptiques. Ainsi, l'effet anti-épileptique d'un régime alimentaire induisant une cétose chronique est empiriquement utilisé en clinique humaine. L'efficacité de ce type de prise en charge alternative a pu être montrée dans certains modèles animaux.

Le régime cétogène est particulièrement employé chez l'enfant. Dans un premier temps, notre étude a donc consisté à préciser la maturation du métabolisme énergétique dans les structures impliquées dans l'épileptogénèse. Notre deuxième objectif a été de préciser l'effet neuroprotecteur éventuel du régime cétogène ainsi que son spectre d'action anti-épileptique. Nous avons comparé l'efficacité du régime cétogène à celle d'un régime glucidique habituel, mais également à celle d'un régime restreint en calories, une autre stratégie thérapeutique proposée.

Première section : Introduction

1.1. Voies métaboliques du glucose et métabolisme énergétique

1.1.1. Voies métaboliques du glucose (Figure 1)

La glycolyse anaérobie est une voie cytosolique. Le glucose est métabolisé en pyruvate avec un bilan global, par mole de glucose, de 2 moles de pyruvate et d'eau formées et 2 moles de NADH réduit. Sur cette voie de 10 réactions successives, 3 sont irréversibles : elles sont catalysées par la 6-hexokinase, la phosphofructokinase et la pyruvate kinase qui sont les cibles de la régulation métabolique. Dans les conditions anaérobies, le pyruvate produit est réduit en lactate, réaction catalysée par la lactate déshydrogénase (LDH).

La glycolyse aérobie : en aérobose, le pyruvate pénètre par un transporteur spécifique dans la matrice mitochondriale. Il y subit une décarboxylation oxydative catalysée par un complexe tri-enzymatique: la pyruvate déshydrogénase. L'acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA) ainsi produit entre dans le cycle des acides tricarboxyliques (CAT). L'un des intermédiaires de ce cycle, l' α -cétoglutarate est un précurseur de la synthèse des principaux neuromédiateurs excitateur et inhibiteur au niveau cérébral : le glutamate et le GABA. A chaque tour du CAT, pour une mole d'acétyl-CoA consommée, 4 moles de NADH et 1 mole de FADH₂ sont réduites. Le bilan énergétique final est la production de 2 moles d'ATP pour une mole de glucose. **La phosphorylation oxydative** est le mécanisme de couplage de l'oxydation de ces nucléotides avec la création de liaisons phosphate de haute énergie sur l'adénosine. Cette cascade de réactions d'oxydo-réduction constitue la chaîne respiratoire catalysée par 4 complexes protéiques localisés dans la membrane interne mitochondriale. Lors du transfert d'électrons de NADH et FADH₂ vers l'accepteur final, l'oxygène, un gradient de protons est créé de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Ce gradient permet la phosphorylation des dérivés de l'adénosine, catalysée par l'ATP synthétase. La cytochrome oxydase (CO), ou complexe IV, est le complexe enzymatique qui termine la chaîne respiratoire mitochondriale, en catalysant l'oxydation du cytochrome C par l'oxygène moléculaire (Lemberg 1969). Au final l'oxydation complète d'une mole de glucose permet la production de 36 ATP.

La néoglucogénèse est la formation de glucose à partir du pyruvate. Elle est catalysée par les mêmes enzymes que la glycolyse, en dehors des trois réactions irréversibles qui sont le siège de la régulation.

La glycogénogénèse est une voie de stockage intra cytoplasmique. Elle aboutit à la formation de glycogène. Elle est peu active dans les cellules du parenchyme cérébral et concerne les astrocytes (Brown et Ransom 2007).

La voie des pentoses, cytosolique, permet la formation de ribose, nécessaire à la synthèse des nucléotides, et la régénération de NADPH utilisé pour les réactions réductrices de biosynthèse, en particulier des acides gras et stéroïdes. Cette voie est modérément active dans le tissu cérébral (Brown et Ransom 2007).

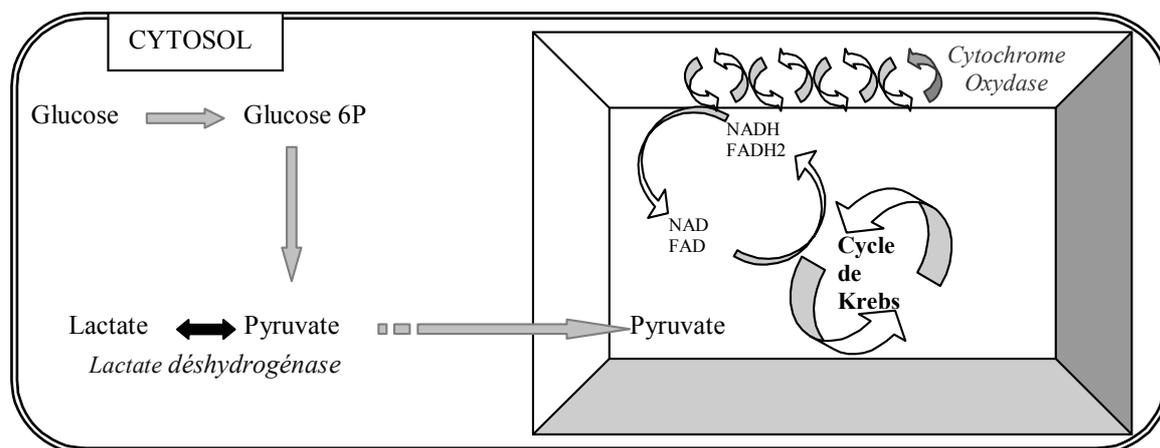


Figure 1 : Voies du métabolisme énergétique du glucose

La lactate déshydrogénase est au carrefour des voies aéro et anaérobies du métabolisme énergétique du glucose. La cytochrome oxydase est l'enzyme finale de la phosphorylation oxydative

1.1.2. Fournisseurs non glucidiques d'acétyl-CoA (Figure 2)

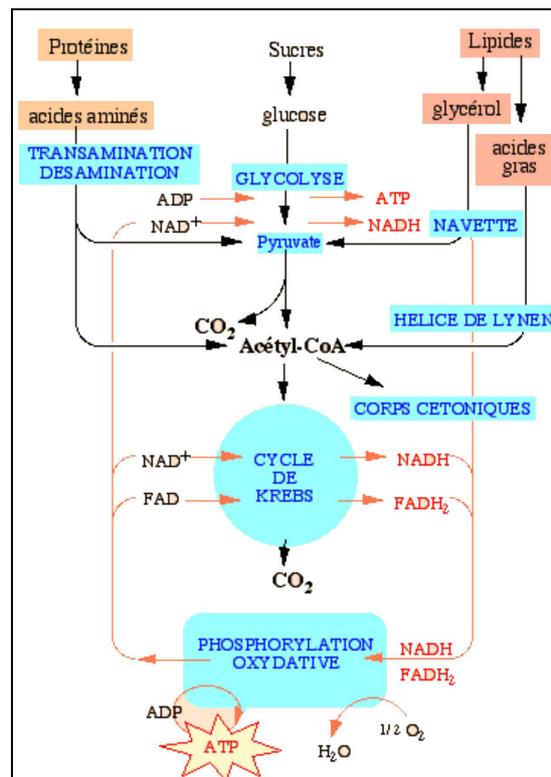


Figure 2 : Fournisseurs d'acétyl-CoA

Les trois types de nutriments, glucides, protides et lipides peuvent contribuer au métabolisme énergétique cellulaire en fournissant de l'acétyl-CoA (d'après Caroline Benlot et Nicole Blanchouin, Biologie et Multimédia - Université Pierre et Marie Curie)

Les acides aminés peuvent être transaminés en acides α-cétoniques. Lors de cette réaction, la chaîne carbonée acceptant le groupement amine est le plus souvent l'α-cétoglutarate, métabolite intermédiaire du CAT, avec formation de glutamate qui sera secondairement désaminé. L'acide α-cétonique peut quant à lui entrer dans le CAT par le biais de l'acétyl-CoA ou des métabolites intermédiaires.

Les acides gras contribuent au métabolisme énergétique: les acides gras libres cytosoliques à longue chaîne de plus de 10 carbones sont activés par liaison au coenzyme A et traversent la membrane interne mitochondriale par liaison transitoire à la carnitine. Les acides gras à chaîne courte entrent librement dans la matrice mitochondriale et y sont activés par liaison au coenzyme A. Les Acyls-CoA formés sont dégradés par une répétition de réactions dite hélice de Lyden, générant à chaque cycle 1 FADH₂, 1 NADH, et un acétyl-CoA. Au final la réaction aboutit à un résidu acétyl-CoA ou succinyl-CoA selon que l'acide gras initial comporte un nombre pair ou impair de carbones.

de GLUT1 correspond à la densité capillaire (Duelli et Kuschinsky 2001, Gerhart, et al. 1989, Vannucci, et al. 1997). **GLUT3** est exprimé dans la membrane des neurones, au niveau des neurites. Les densités de GLUT1 et GLUT3 sont corrélées au niveau d'utilisation cérébrale locale de glucose (Nehlig, et al. 1988, Vannucci 1994).

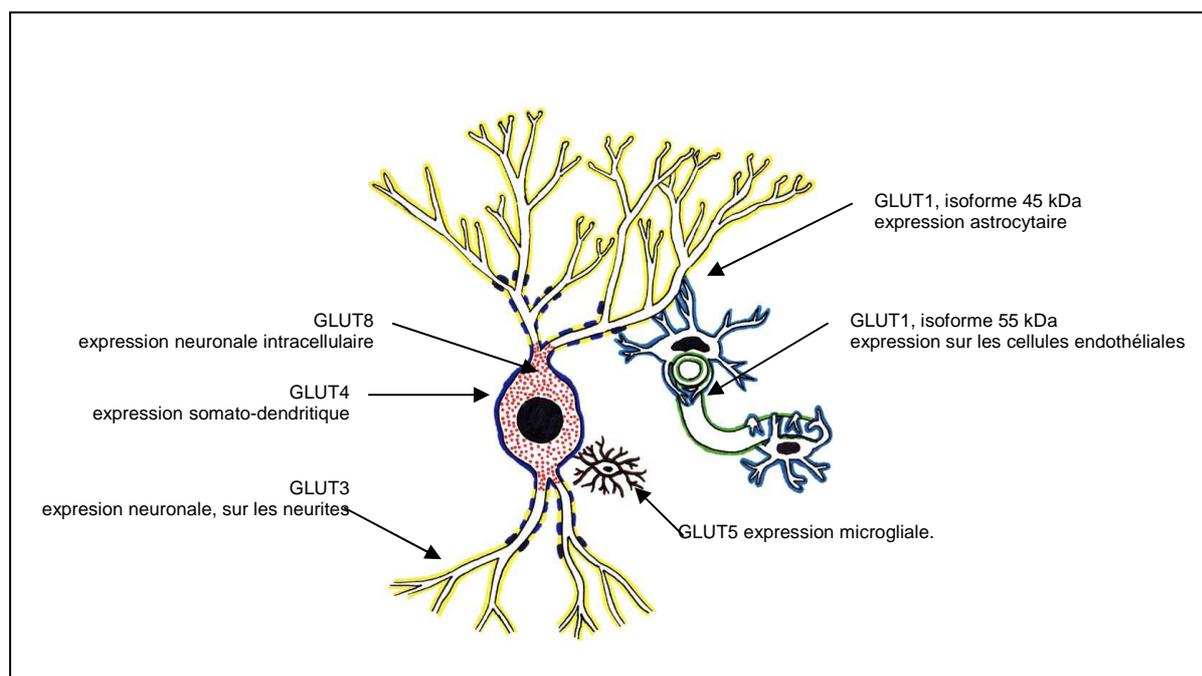


Figure 4 : localisation cérébrale des transporteurs du glucose

L'expression astrocytaire de GLUT2 n'est pas figurée sur ce schéma (d'après McEwen, 2004)

1.1.3.2. Les transporteurs d'acides monocarboxyliques (Figure 5)

Actuellement, 14 transporteurs d'acides monocarboxyliques (MCT) ont été identifiés et 4 caractérisés fonctionnellement. Grâce à un gradient de protons, ils permettent le passage transmembranaire d'un proton contre un acide monocarboxylique. Les MCT présentent des expressions topographiques et des affinités respectivement différentes pour leurs substrats physiologiques: lactate, pyruvate, acetoacétate et β -hydroxybutyrate.

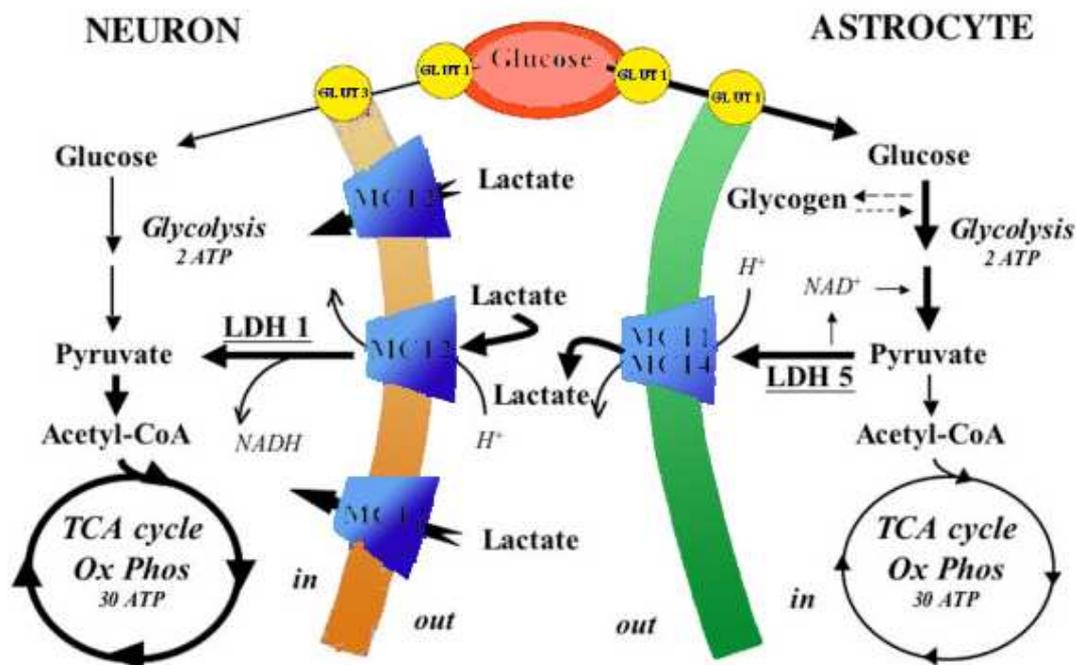


Figure 5 : Transporteurs d'acides monocarboxyliques

La localisation des transporteurs d'acides monocarboxyliques au niveau des membranes cellulaires permettrait, en cas de demande métabolique énergétique importante, l'utilisation par les neurones du lactate produit par les astrocytes (d'après Pellerin, 2007).

MCT1 est peu sélectif, il présente une distribution ubiquitaire au niveau du système nerveux central. Au niveau cellulaire il est distribué le long de la barrière hémato-encéphalique sur les côté luminal et ab-luminal des vaisseaux sanguins, ainsi que dans la glie limitante, les cellules épendymaires, les astrocytes, les neurites et les corps cellulaires de certains neurones hypothalamiques, corticaux et cellules pyramidales de CA1 dans l'hippocampe. **MCT2** présente une grande affinité pour le lactate, il serait situé là où il faut capter le lactate. MCT2 est le transporteur le plus densément exprimé au niveau neuronal, surtout sur les neurites, en particulier dans la région dendritique proche de la synapse. L'expression de MCT2 est peu importante dans les astrocytes et la glie limitante.

MCT3 est un transporteur peu sélectif, présent uniquement sur la membrane baso latérale de l'épithélium pigmentaire de la rétine.

MCT4 présente une faible affinité pour le lactate, il servirait à faire sortir le lactate de tissus à haut niveau glycolytique anaérobie. Il est très densément exprimé sur la membrane astrocytaire (Gerhart, et al. 1997, Pellerin, et al. 1998a,b, Vannucci et Simpson 2003, Pellerin, et al. 2005).

L'expression des MCT chez l'animal adulte est sous la dépendance de l'activité métabolique: les régions qui présentent un niveau élevé de captation du glucose sont également capables de transporter des quantités augmentées d'acides monocarboxyliques. Par ailleurs, un régime cétogène diminue l'expression de MCT1 sur l'endothélium vasculaire cérébral. (Maurer, et al. 2004).

1.1.4. Dynamique du métabolisme énergétique cérébral chez l'animal adulte

1.1.4.1. Voies métaboliques du glutamate et du GABA

Le glutamate, principal neurotransmetteur excitateur au niveau cérébral, est un acide aminé qui ne passe pas la barrière hémato-encéphalique. Il est synthétisé in situ dans le parenchyme cérébral. Son principal précurseur est la glutamine qui est désaminée par la glutaminase mitochondriale.

Le GABA, principal neuromédiateur inhibiteur cérébral, est formé par décarboxylation du glutamate catalysée par la glutamate décarboxylase cytosolique. Il est inactivé par transamination avec l' α -cétoglutarate: cette réaction catalysée par la GABA transaminase mitochondriale régénère le glutamate et fournit une molécule d'aldéhyde semi-succinique. Cet aldéhyde peut être déshydrogéné par l'aldéhyde semi-succinique déshydrogénase en succinate. L' α -cétoglutarate et le succinate, molécules intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques, relie donc directement l'anabolisme et le catabolisme du GABA au métabolisme énergétique.

1.1.4.2. Compartimentation du métabolisme du glutamate (Figure 6)

Au niveau cérébral, la compartimentation du métabolisme du glutamate est le fait du monopole astrocytaire de deux enzymes: la glutamine synthétase (Martinez-Hernandez, et al. 1977) et la pyruvate carboxylase (Shank, et al. 1985, Yu, et al. 1983).

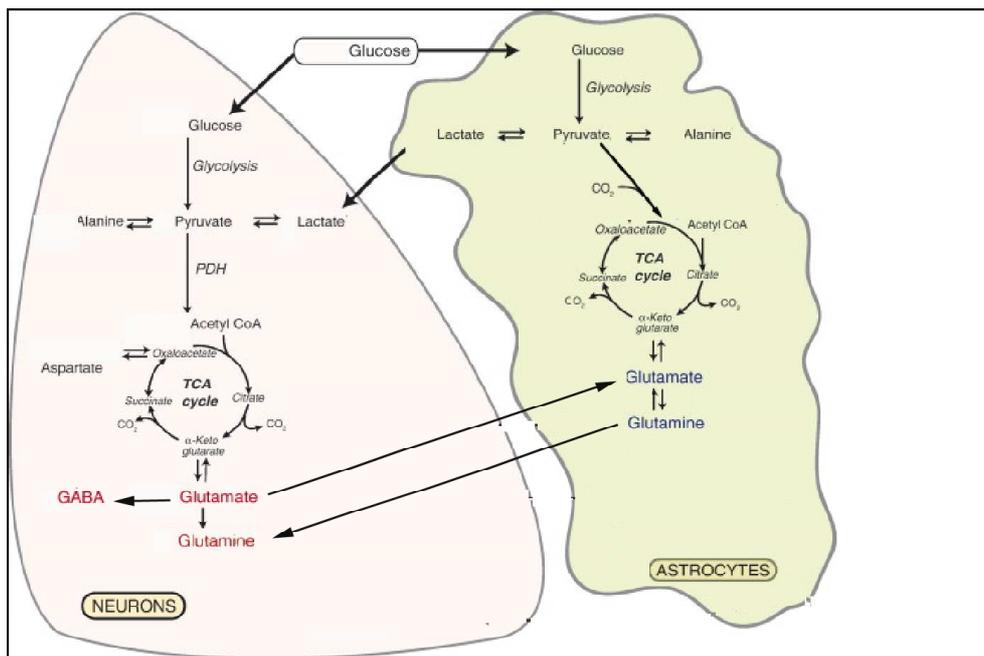


Figure 6 : Compartimentation du métabolisme du glutamate

Le cycle glutamate/glutamine entre astrocytes et neurones permet de reconstituer le stock de glutamate neuronal et de maintenir un bas niveau de glutamate dans la fente synaptique (d'après Melo, 2007).

Lorsqu'il est libéré dans la fente synaptique par la terminaison neuronale, l'essentiel du glutamate est rapidement capté dans l'astrocyte par un transporteur Na^+ dépendant puis métabolisé en glutamine. Cette réaction est catalysée par la glutamine synthétase. La glutamine formée peut être libérée dans l'espace extra cellulaire pour être recaptée par le neurone, où elle est préférentiellement hydrolysée en glutamate par la glutaminase mitochondriale. Ce cycle glutamate/glutamine permet l'efficacité de la neurotransmission en maintenant un bas niveau de glutamate dans la fente synaptique à l'état de base, et en permettant la constante et rapide reconstitution du stock de glutamate dans la terminaison présynaptique (Daikhin et Yudkoff 2000).

En parallèle, le GABA est synthétisé par décarboxylation du glutamate grâce à une enzyme, la GAD (Glutamic Acid Decarboxylase), présente dans la fraction cytosolique des terminaisons axonales GABAergiques.

Dans le compartiment astrocytaire, la voie de la pyruvate carboxylase est la principale voie anaplérotique des intermédiaires du CAT et des neurotransmetteurs dérivés glutamate et GABA (Patel, et al. 1974). A partir du pyruvate, la pyruvate carboxylase catalyse la synthèse d'oxalo-acétate qui combiné à une molécule d'acétyl-CoA produit une molécule de citrate. Le citrate peut être métabolisé en α -cétoglutarate, précurseur immédiat du glutamate. Dans le compartiment neuronal, en revanche, le pyruvate ne peut entrer dans le CAT que par le biais de l'acétyl-CoA, et il n'y a donc pas d'intermédiaires du CAT supplémentaires produits.

1.1.4.3. Couplage métabolique Astrocyte - Neurone

Le cerveau est l'un des organes dont le niveau métabolique est le plus élevé. Le glucose est le métabolite énergétique principal du parenchyme cérébral chez l'animal adulte (Sokoloff 1981). En dehors d'un stock limité de glycogène astrocytaire (Brown et Ransom 2007), le métabolisme énergétique cérébral est donc sous la dépendance de l'apport continu de glucose par le débit sanguin dont il en extrait en moyenne 8% (Hawkins, et al. 1983, Sokoloff 1981). Lors du jeûne, le glucose sanguin est approvisionné principalement par la glycogénolyse hépatique. L'utilisation cérébrale locale de glucose (UCLG) est hétérogène, corrélée au niveau d'activité fonctionnelle. Le débit sanguin cérébral régional est lui-même étroitement corrélé à la consommation régionale de glucose.

Pour entrer dans le parenchyme cérébral, le glucose traverse la barrière hémato-encéphalique. Ce transport est facilité par GLUT1 localisé sur les cellules endothéliales et les prolongements astrocytaires et par GLUT3 sur les neurones. La moitié du glucose qui sort des capillaires traverse l'espace extra-cellulaire pour ensuite entrer dans les neurones. L'autre moitié est captée par les astrocytes. Après une 6-phosphorylation, le glucose suit la voie de la glycolyse. Au repos, l'adéquation entre les consommations de glucose et d'oxygène permet l'oxydation de l'essentiel du glucose, avec un excès modéré de pyruvate réduit en lactate (Nehlig et Coles 2007). Dans les conditions métaboliques de base, le métabolisme oxydatif est déjà proche de son potentiel maximal. Le métabolisme cérébral du glucose n'est donc pas limité par le transport mais par les capacités de phosphorylation (Furler, et al. 1991, Robinson et Rapoport 1986).

Lors d'une activation physiologique, certains auteurs montrent un découplage entre utilisation locale de glucose et consommation d'oxygène qui augmente dans un rapport 10 fois moindre. Pour ces auteurs, la demande métabolique serait alors couverte par la glycolyse anaérobie et la formation de lactate. Dans cette situation de demande énergétique, on pourrait formuler

l'hypothèse d'une utilisation par les neurones du lactate extracellulaire issu du compartiment sanguin. Cependant il est montré que le lactate utilisé par le cerveau est produit majoritairement in situ (Bouzier, et al. 2000, Hassel et Brathe 2000).

Un modèle de compartimentation du métabolisme du glucose est proposé par Magistretti, dit "Astrocyte Neuron Lactate Shuttle Hypothesis" (ANLSH) (Figure 7). La LDH et les MCT1-2-4 sont les éléments clefs de cette hypothèse. La LDH existe sous forme de cinq isoenzymes, combinaisons de deux sous-unités différentes, H et M, au sein d'un tétramère. Les sous-unités M sont localisées préférentiellement dans les astrocytes, les sous unités H dans les neurones. Les propriétés de la forme H₄ favorisent l'oxydation du lactate en pyruvate; celles de la forme M₄ favorisent une réduction rapide du pyruvate en lactate (Bittar, et al. 1995, Tholey, et al. 1981). Les MCT1 et 4, d'affinité respectivement intermédiaire et faible pour le lactate sont localisés sur l'astrocyte, alors que MCT2 de forte affinité pour le lactate est localisé sur la membrane neuronale. Lors de l'activation neuronale, la concentration du glutamate augmente dans l'espace extracellulaire. Le glutamate est capturé par les astrocytes, ce transport est Na⁺ dépendant. Dans l'astrocyte, l'augmentation de la concentration de glutamate stimule à son tour la pompe Na⁺/K⁺/ATPase et l'activité glutamine synthétase, et in fine la glycolyse anaérobie. Le lactate formé est externalisé via MCT1 et MCT4 dans la matrice extra-cellulaire où il est capté par les neurones via MCT2. Dans le cytosol neuronal, le lactate est oxydé en pyruvate qui peut entrer dans le CAT mitochondrial.

De manière globale, l'activation neuronale conduit à une surproduction de lactate par le compartiment astrocytaire, qui peut en retour être utilisé comme substrat énergétique supplémentaire par le neurone. L'utilisation continue du lactate produit explique que le taux de lactate reste bas dans le cerveau (Pellerin et Magistretti 1994, Tsacopoulos et Magistretti 1996, Magistretti, et al. 1999, Pellerin, et al. 2007). Cependant l'utilisation neuronale du lactate produit par l'astrocyte n'a actuellement pas pu être montrée in vivo.

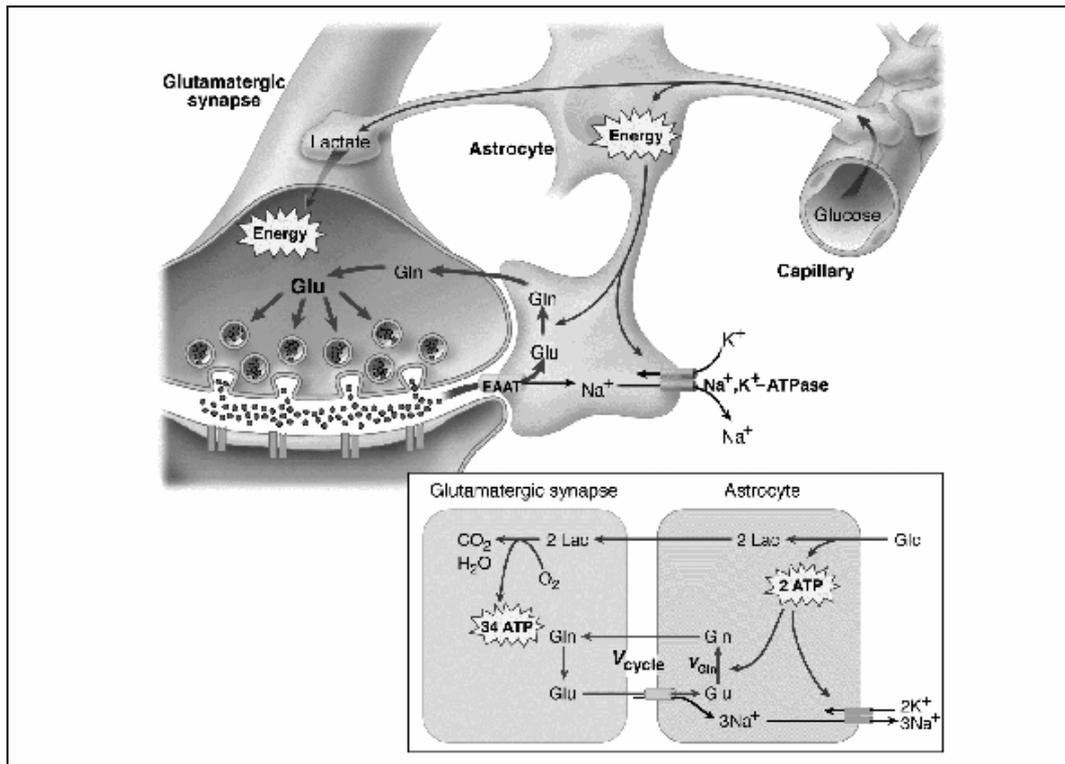


Figure 7 : Couplage métabolique astrocyte/neurone

Par le biais du glutamate, l'activation neuronale active la glycolyse anaérobie astrocytaire. Ceci conduit à la formation de lactate qui pourra être en retour utilisé dans le compartiment neuronal (d'après Magistretti, 1999).

1.1.5. Particularités du métabolisme énergétique cérébral de l'animal en développement

1.1.5.1. Maturation enzymatique

Le potentiel oxydatif du glucose global du tissu cérébral augmente de manière considérable entre le nouveau-né et l'âge adulte. La maturation enzymatique est corrélée avec les changements observés pour l'UCLG. L'étude du profil de maturation de la LDH, au carrefour des voies anaéro et aérobie du métabolisme énergétique du glucose, et de la CO, enzyme finale de la voie aérobie, montre une augmentation du potentiel oxydatif qui atteint un niveau comparable à celui des adultes dans la plupart des structures dès la fin du premier mois post-natal chez le rat (Bilger et Nehlig 1991).

Pour ce qui est du métabolisme des composés cétoniques, les enzymes impliquées dans leurs métabolisme ont deux profils différents de maturation postnatale: la β -hydroxybutyrate déshydrogénase et la β -cétocoacyl-CoA transférase ont des niveaux d'activité faible à la naissance, qui augmentent dans les 3 premières semaines de vie, avant de diminuer jusqu'à des niveaux aussi faible qu'initialement. L'acétoacétyl-CoA thiolase a quant à elle un niveau d'activité maximal de la naissance jusqu'à la fin du premier mois de vie qui diminue ensuite progressivement (Dierks-Ventling et Cone 1971, Nehlig et Lehr 1982, Bilger et Nehlig 1992).

1.1.5.2. Maturation des transporteurs

La consommation d'oxygène du cerveau de rat à la période néonatale est très nettement inférieure à celle du niveau du cerveau de l'animal adulte (Altman, et al. 1993). La compartimentation métabolique n'intéresse pas dans le cerveau immature (Patel et Balazs 1970).

GLUT1 et GLUT3 ont des densités corrélées avec l'UCLG y compris pendant la maturation postnatale normale (Nehlig, et al. 1988, Vannucci 1994). La densité de GLUT3 est par ailleurs directement fonction de la maturation et de l'activité fonctionnelle neuronale.

MCT1 est transitoirement exprimé durant l'embryogenèse au niveau des neurones de certains cortex (Baud, et al. 2003, Fayol, et al. 2004). La densité régionale des transporteurs vasculaires d'acides monocarboxyliques, MCT1, diminue au cours du développement alors celle des transporteurs neuronaux et gliaux reste stable. Alors que la densité de MCT1 sur la barrière hémato-méningée est faible chez les animaux matures, elle est significativement plus importante chez les nouveaux-nés (Pellerin, et al. 2005). Dans les premières heures de vie, le lactate sanguin, de concentration élevée, peut être utilisée comme substrat énergétique cérébral (Nehlig, et al. 1993). Chez le rat immature, et en particulier pendant la lactation, l'expression de MCT1 est élevée au niveau de la barrière hémato-encéphalique. Les composés cétoniques, β -hydroxybutyrate et acétoacétate circulants pénètrent dans le parenchyme cérébral proportionnellement à leur concentration artérielle pour être utilisés comme substrats énergétique (Hawkins, et al. 1971, Nehlig 1999, Nehlig 2004). Contrairement au glucose, c'est cette étape de passage de la barrière hémato-encéphalique qui est limitante pour l'utilisation des composés cétoniques comme substrats énergétiques.

1.1.6. Métabolisme du glucose et épilepsies

1.1.6.1. Métabolisme cérébral lors d'une crise épileptique prolongée

On estime à 80% la dépense énergétique cérébrale pour le maintien de l'équilibre ionique transmembranaire et la génération d'une activité électrique. Lors d'un état de mal épileptique l'utilisation cérébrale locale de glucose augmente précocement, habituellement de façon diffuse, avant de revenir dans un deuxième temps à un niveau comparable aux conditions de base. Une troisième phase d'hypométabolisme peut être observée lorsque la crise se poursuit. Cet hypométabolisme concerne alors les structures qui seront secondairement lésées chez l'animal adulte (Howse 1983, Nevander, et al. 1985). Une telle corrélation n'est pas vérifiée chez les animaux immatures (Nehlig, et al. 1996).

La demande énergétique cérébrale est considérablement augmentée lors d'une crise épileptique prolongée (Fernandes, et al. 1999). Cette augmentation de la demande métabolique dépasse largement les capacités de transport de glucose à travers la barrière hémato-encéphalique chez les animaux matures (Chapman, et al. 1977) comme immatures (Fujikawa, et al. 1988, Fujikawa, et al. 1989, Nehlig, et al. 2006). Cette limitation de capacité de transport du glucose pourrait être l'un des mécanismes responsables des dommages neuronaux après un état de mal, en particulier chez l'animal immature.

Les modifications des transporteurs membranaires du glucose lors d'un état de mal sont décrites dans le modèle de crises induites par Lithium-Pilocarpine. On observe à la phase aiguë dans ce modèle, une augmentation de l'expression cérébrale des transporteurs transmembranaires du glucose et des acides monocarboxyliques. Au niveau de la barrière hémato-encéphalique, l'augmentation de GLUT1 est diffuse et plus marquée chez les animaux adultes. En revanche l'augmentation du transporteur neuronal GLUT3 intéresse surtout les animaux immatures P10. Le transporteur peu sélectif de la barrière hémato encéphalique MCT1 est surexprimé après un état de mal quel que soit l'âge, mais 5 à 10 fois plus chez l'adulte que chez l'animal immature. Le transporteur neuronal MCT2 qui a une grande affinité pour le lactate augmente surtout chez les adultes. L'augmentation de l'expression des systèmes de transport transmembranaires des substrats énergétiques paraît adaptés (1) à l'augmentation de la demande énergétique au cours de l'état de mal, permettant d'apporter à chaque âge une quantité accrue de glucose au cours des crises (2) ainsi qu'à la surproduction de lactate par la glycolyse anaérobie (Leroy, Simpson, Vannucci, Nehlig, résultats non publiés). Ce lactate est

potentiellement délétère pour la survie cellulaire. L'augmentation de l'expression de MCT1 et MCT2 permet donc d'extruder le lactate plus facilement du cerveau vers le sang circulant, en particulier chez l'adulte chez lequel la concentration cérébrale de lactate augmente fortement et rapidement pendant les crises épileptiques.

1.1.6.2. Métabolisme cérébral et épilepsie

Une approche alternative du niveau de l'activité fonctionnelle cérébrale est possible par l'étude des variations du débit sanguin cérébral local qui sont habituellement couplées à celles du métabolisme cérébral (Sokoloff 1981). Les épilepsies temporales sont les plus fréquentes des épilepsies réfractaires et la tomographie par émission monophotonique fait partie des explorations de routine du bilan préchirurgical. On dispose donc chez l'Homme de nombreuses données sur les modifications de débit sanguin cérébral local dans les épilepsies partielles pharmacorésistantes. Dans les cas d'épilepsie mésiale temporale, on observe habituellement une augmentation du débit sanguin cérébral local critique au niveau du lobe temporal homolatéral (Newton, et al. 1992). En période inter-critique, on peut assez souvent observer un hypodébit qui déborde en général la zone épileptogène. Les images de soustraction entre débit critique et inter critique sont en particulier performantes pour localiser cette zone (Zubal, et al. 1995).

Les informations concernant directement le métabolisme glucidique inter-critique cérébral chez l'homme sont accessibles en tomographie par émission de positons au fluorodésoxyglucose-(¹⁸F). L'hypométabolisme inter-critique observé peut être plus important qu'une lésion éventuelle, mais il garde une bonne valeur localisatrice (Duncan 1997). L'intensité de l'hypométabolisme est plus importante en cas de sclérose de l'hippocampe (Hajek, et al. 1993). Dans les modèles animaux, la méthode au 2-désoxyglucose décrite par Sokoloff (Sokoloff, et al. 1977) permet de déterminer le taux d'utilisation cérébrale locale de glucose par autoradiographie. Un hypométabolisme inter-critique est également mis en évidence (Bruehl, et al. 1995).

La physiopathologie de ces modifications de métabolisme cérébral est encore incomplètement élucidée : elle peut s'expliquer à la fois par les dommages tissulaires au niveau d'une lésion cérébrale elle-même, mais également par les modifications fonctionnelles au sein du réseau auquel elle appartient (Ryvlin 1997).

1.2. Régime cétogène

1.2.1. Aspects cliniques

A partir du constat empirique de diminution du nombre de crises épileptiques chez des patients lors de jeûnes, le régime cétogène est développé et utilisé en clinique humaine depuis le début du XX^e siècle (Hartman et Vining 2007, Swink, et al. 1997, Vining, et al. 1998). Son efficacité a pu être montrée à tous les âges, chez les adultes (Sirven, et al. 1999) mais en particulier chez les adolescents (Mady, et al. 2003) et les enfants (Freeman, et al. 2007, Kossoff, et al. 2004). Sans distinction de type de crise ni d'épilepsie, le régime cétogène permet chez la moitié des patient la réduction d'au moins 50% de la fréquence des crises (Freeman, et al. 1998, Schwartz, et al. 1989a, Vining, et al. 1998).

En pratique, le régime cétogène est un régime alimentaire restreint en glucides avec classiquement, une restriction calorique modérée associée (Bough, et al. 2000a, Bough, et al. 2000b, Greene, et al. 2001, Greene, et al. 2003). L'essentiel de l'apport énergétique est assuré par l'apport de lipides. Habituellement, le régime est débuté après un jeûne de 24 heures qui permet d'initier plus rapidement la synthèse de composés cétoniques. Le régime cétogène atteint son maximum d'efficacité anti-épileptique après plusieurs semaines d'introduction (Freeman, et al. 2006). Le ratio du régime cétogène est le rapport entre la quantité de protéines + glucides alimentaire et celle de lipides. Il est habituellement de 4 pour 1, mais peut être modifié pour la prise en charge des patients: un ratio moins élevé permet d'améliorer la tolérance, alors qu'un ratio plus élevé semble être plus efficace pour le contrôle des crises (Freeman, et al. 2006).

1.2.2. Régime cétogène: données expérimentales chez l'animal

Chez les rongeurs, le régime cétogène a une efficacité anti-convulsivante chez les animaux immatures (Bough, et al. 1999b, Otani, et al. 1984, Uhlemann et Neims 1972) comme chez les adultes (Appleton et DeVivo 1974, Muller-Schwarze, et al. 1999). Une augmentation des seuils de crises de 15 à 20% est rapportée (Appleton et DeVivo 1974, Bough, et al. 1999b, Rho, et al. 1999). L'efficacité est maximale après deux semaines de régime (Appleton et DeVivo 1974, Bough et Eagles 1999, Bough, et al. 2006, Freeman, et al. 2006, Rho, et al. 1999). L'efficacité supérieure de ratios plus élevés est également démontrée (Bough, et al. 1999a, Bough, et al. 1999b).

L'efficacité d'un régime glucidique hypocalorique pour augmenter le seuil des crises est également rapportée (Bough, et al. 2003). Une restriction calorique de 50% semble aussi efficace qu'un régime cétogène, bien qu'elle induise une cétose significativement moins importante (Eagles, et al. 2003).

1.2.3. Mécanismes d'action du régime cétogène

Dans le cadre de l'épilepsie, le mécanisme d'action du régime cétogène n'est pas complètement élucidé. Il ne reproduit pas seulement les conditions métaboliques du jeûne prolongé, et son mode d'action n'est pas univoque. D'une part il semble que les composés cétoniques modifient la cinétique du cycle des acides tricarboxyliques et augmentent la synthèse cérébrale de GABA, neuromédiateur inhibiteur. Par ailleurs, les composés cétoniques peuvent limiter la formation de radicaux oxydants libres induits par le glutamate. D'autre part, le régime cétogène favorise la biosynthèse des mitochondries et donc la capacité de production d'énergie. L'inhibition de la glycolyse anaérobie induirait une diminution de l'excitabilité neuronale (Maalouf, et al. 2007, Bough et Rho 2007, Huang et McNamara 2006, Hartman, et al. 2007, Bough, et al. 2007).

1.3. Modèles animaux utilisés

1.3.1. Le modèle Lithium-Pilocarpine chez le rat

1.3.1.1. Pharmacodynamique du modèle

La pilocarpine est un agoniste cholinergique. Au niveau cérébral, en dehors du cervelet, les récepteurs les plus exprimés sont les récepteurs muscariniques M1. Ces récepteurs sont surtout représentés au niveau des cortex, du striatum, des ganglions de la base et de l'hippocampe. Il s'agit de récepteurs métabotropiques, couplés par des protéines G à l'activation de la phospholipase C qui hydrolyse un phospholipide membranaire, le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ce qui aboutit à la synthèse de seconds messagers: l'inositol-1,4,5-trisphosphate et le diacyl-glycérol. L'augmentation des phosphoinositides active via l'adénylate cyclase la formation d'AMPC et la fermeture de canaux potassiques. Il en résulte une dépolarisation membranaire (Hirvonen et Savolainen 1991, Gonzales et Crews 1984).

La fixation d'un agoniste sur les récepteurs de type M1 entraîne à l'échelon cellulaire une augmentation de la fréquence de décharge neuronale. A l'échelon macroscopique, cette activation des récepteurs M1 peut induire des crises épileptiques (Cruickshank, et al. 1994), c'est à dire une décharge de potentiels hypersynchrones dans un réseau neuronal cérébral impliquant des neurones corticaux. L'administration préalable de lithium permet de réduire d'un rapport proche de 20 la dose de pilocarpine pour obtenir les mêmes effets pro-convulsivants (Morrison, et al. 1971). Cette potentialisation serait le fait d'une modification de la réponse médiée par les phosphoinositides, une augmentation de la libération d'acétylcholine et une modification d'affinité des récepteurs (Casebolt et Jope 1987, Jope et Williams 1994, Whitworth, et al. 1989, Hruska, et al. 1984). Les caractéristiques cliniques, électroencéphalographiques et histologiques du modèle Lithium-Pilocarpine sont les mêmes que celle du modèle Pilocarpine avec une meilleure reproductibilité et une mortalité moindre (Clifford, et al. 1987b).

1.3.1.2. *Caractéristiques du modèle Lithium-Pilocarpine chez l'animal adulte*

Le modèle Lithium-Pilocarpine reproduit les caractéristiques cliniques principales de l'épilepsie mésiale temporale chez l'Homme. Il évolue en trois phases: aiguë, silencieuse et chronique.

La phase aiguë, de l'agression initiale, est l'état de mal induit par la pilocarpine. Les modifications comportementales débutent moins de 10 min après l'injection de pilocarpine: motricité volontaire diminuée, ataxie et cessation de l'activité d'exploration, hochements de tête, grattage, défécation et urination. Après environ 20 min, les rats présentent des crises motrices limbiques avec mâchonnement, salivation, clonies des membres antérieurs, redressements et perte du contrôle postural. L'état de mal survient habituellement au bout de 25 min; il est défini à posteriori après 30 minutes ininterrompues d'un comportement correspondant à une activité critique (Turski, et al. 1983, Cavalheiro, et al. 1987). Les structures impliquées précocement dans le déroulement de l'état de mal sont celles où l'on retrouve une expression dense de récepteurs M1: ganglions de la base, complexe amygdalo-hippocampique (Hirsch, et al. 1992, Motte, et al. 1998, Handforth et Treiman 1995).

La phase cliniquement silencieuse dure de 4 à 44 jours, en moyenne 14 à 25 jours selon les études. Aucune crise clinique n'est alors visible, mais les animaux présentent des patterns électroencéphalographiques reproductibles sur un rythme de fond normal: précocement des bouffées de pointe-ondes bilatérales, secondairement des pointes ou pointe-ondes isolées suivies de rythmes rapides de faible amplitude (Andre, et al. 2000a,b).

La phase chronique succède à la phase d'épileptogénèse: tous les animaux adultes lors de l'état de mal présentent secondairement des crises limbiques secondairement généralisées récurrentes et spontanées. La première crise observée définit le début de la phase chronique, même si pendant cette phase la symptomatologie critique continue à évoluer avec des crises de plus en plus motrices et longues (Leite, et al. 1990, Cavalheiro 1995).

Les modifications métaboliques précoces caractéristiques du métabolisme énergétique à la phase aiguë du modèle Lithium-Pilocarpine sont des augmentations d'un facteur 3 à 6 des niveaux d'utilisation cérébrale locale du glucose (Nehlig, et al. 1988, Fernandes, et al. 1999).

Durant la phase d'épileptogénèse et la phase chronique, les niveaux d'UCLG diminuent dans les structures lésées (Dube, et al. 2000b).

Sur le plan neuropathologique, le modèle Lithium-Pilocarpine est un modèle d'épilepsie lésionnel: les lésions sont observées au niveau des cortex entorhinal et piriforme, du thalamus, des structures hippocampiques: Corne d'Ammon 1 et 3 (CA1 et CA3), gyrus denté (GD), cortex parahippocampiques: cortex entorhinal et piriforme, septum, amygdale (Turski, et al. 1983, Turski, et al. 1989, Cavalheiro 1995, Dube, et al. 2000b, Dube, et al. 2001a). Les dommages neuronaux concernent principalement les couches II et III des cortex piriforme et entorhinal qui sont presque entièrement détruites. Les dommages cellulaires concernent également les cellules moussues et certaines populations d'interneurones du hile du gyrus denté de l'hippocampe, les cellules pyramidales et interneurones de CA1 (Freund, et al. 1992, Obenaus, et al. 1993, Sloviter 1991). Ce sont ces pertes neuronales qui induisent pendant la phase d'épileptogénèse une réorganisation tissulaire avec prolifération des fibres moussues et création d'un néo-circuit hypercitable qui sous-tend la survenue de crises récurrentes spontanées. (Cavalheiro 1995, Dube, et al. 2000b).

1.3.1.3. Caractéristiques du modèle Lithium-Pilocarpine chez l'animal immature

Chez le rat immature, les caractéristiques du modèle sont différentes de celles du rat adulte (Cavalheiro, et al. 1987, Dube, et al. 2000b, Dube et al. 2001a,b).

Pendant la phase aiguë, la sensibilité des animaux à la pilocarpine croît avec l'âge. En effet, les animaux immatures ne présentent pas d'état de mal secondaire à l'injection de lithium et pilocarpine avant P10, la dose nécessaire étant ensuite de moins en moins élevée, jusqu'à l'âge adulte (Patel, et al. 1988, Hirsch, et al. 1992). Chez les rats de 10 jours, on observe un état de mal caractérisé rapidement par une akinésie avec des hochements de tête, grattage, tremblements de tout le corps puis extension tonique des pattes postérieures et de la queue. Le délai de survenue de l'état de mal est d'environ 50 min après l'injection de pilocarpine. Les rats de 21 jours présentent une séméiologie et un déroulement des crises qui s'apparente plus à ceux des animaux adultes, malgré des redressements et chutes moins fréquents. L'état de mal survient rapidement après les premières manifestations motrices, dans un délai de 40 min après la pilocarpine (Hirsch, et al. 1992, Persinger et Bradley 1988).

Pour les phases latente et chronique, les caractéristiques dépendent également de l'âge chez les animaux immatures. Avant P18, l'état de mal n'entraîne pas d'épilepsie ultérieure ni de perte neuronale à long terme (Dube, et al. 2000b, Dube, et al. 2001a). Si l'état de mal est induit à P21 seulement deux tiers des animaux évoluent vers une épilepsie ultérieure avec une latence de survenue beaucoup plus longue que chez l'adulte, de 37 à 73 jours, en moyenne 60 jours (Cavalheiro, et al.1987, Sankar, et al. 1998, Roch, et al. 2002b, Priel, et al. 1996). Les lésions histologiques sont également moins étendues. A P21 les pertes neuronales sont uniquement observées dans l'amygdale médiale, le hile du gyrus denté, les cortex parahippocampiques et le thalamus latéral (Dube, et al. 2001a).

Les modifications du métabolisme énergétique sont, quel que soit l'âge au moment de l'état de mal, des augmentations des niveaux d'utilisation cérébrale locale du glucose (Nehlig, et al. 1988, Fernandes, et al. 1999). Une surexpression de GLUT3 est montrée dans les structures hippocampiques CA1, CA3 et hile chez des rats soumis à P9 à un état de mal Lithium-Pilocarpine (Santiago, et al. 2006). Comme chez les adultes, les niveaux d'UCLG secondairement dans les structures lésées chez les rats P21 au moment de l'état de mal. On n'observe pas de modification tardive d'UCLG chez les rats P10.

Les dommages neuronaux sont observés dans les mêmes structures mais avec une sévérité moindre pour les rats P21 au moment de l'état de mal. Les rats P10 ne sont pas lésés (Dube, et al.2000a,b, Dube, et al. 2001a).

1.3.2. Le modèle de crises induites par le Pentylènetetrazole chez le rat

Pour explorer l'activité anti-épileptique du régime cétogène sur différents types de crises, il est nécessaire d'utiliser un modèle dans lequel les manifestations cliniques et électroencéphalographique se succèdent graduellement ce qui permet la détermination de seuils. Ni l'état de mal initial ni l'épilepsie secondaire induits par le Lithium Pilocarpine ne le permettent. Nous avons donc choisi d'utiliser le modèle de crises induites par le pentylènetetrazole (PTZ) chez le rat. Ce modèle de crises est le modèle pharmacologique le plus utilisé pour valider l'efficacité des traitements anti-épileptiques (White 2003).

Le PTZ est un antagoniste non compétitif sur le site benzodiazépine du récepteur ionotropique GABA A. Les études électrophysiologiques montrent qu'il est responsable d'une augmentation de la fréquence des potentiels d'action (Pritchett, et al. 1989, Squires, et al. 1984).

Chez l'animal, quel que soit son âge, l'injection systémique de PTZ induit des crises sans provoquer de lésion neuronale à long terme ni d'épilepsie secondaire (el Hamdi, et al. 1992, Pereira de Vasconcelos, et al. 1992, Nehlig et Pereira de Vasconcelos 1996). Les caractéristiques des crises induites par l'injection de doses successives croissantes de PTZ sont connues. A des doses faibles de PTZ, les animaux présentent des crises généralisées non convulsives, caractérisées par un arrêt de l'activité contemporaine de bouffées bilatérales de pointe-ondes et considérées comme un modèle d'absence (Andre, et al. 1998, McLean, et al. 2004, Snead 1992). Pour des doses plus élevées, les crises se caractérisent par des manifestations motrices cloniques, puis toniques alors qu'on observe une activité de pointes rapides de grande amplitude sur l'EEG (Andre, et al. 1998, el Hamdi, et al. 1992, Mirski et Ferrendelli 1984).

1.4. Objectifs

1.4.1. Métabolisme énergétique, maturation et épileptogénèse

1.4.1.1. Maturation des voies anaéro et aérobie du métabolisme énergétique du glucose

La LDH est au carrefour entre le métabolisme aéro et anaérobie du glucose. La CO est l'enzyme finale de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ce sont deux des enzymes clés du métabolisme énergétique. Leur maturation est corrélée avec les changements observés pour l'UCLG (Bilger et Nehlig 1991). Le premier objectif de ce travail est de préciser la description du profil de maturation post-natale de LDH et CO en particulier dans les structures cérébrales impliquées dans les mécanismes d'épileptogénèse et de contrôle des crises épileptiques. Pour ces études concernant les aspects maturatifs, nous avons choisi d'étudier chez le rat les stades P10, P21 et P35. Ils correspondent respectivement au nouveau-né humain à terme, à l'enfant de 9 à 10 ans et au début de la puberté (Romijn, et al. 1991, Dobbing et Sands 1979). De jeunes rats adultes sont également étudiés. Les aspects du vieillissement ne sont pas envisagés.

1.4.1.2. influence d'un état de mal induit par le Lithium-Pilocarpine sur la maturation du métabolisme énergétique du glucose

Pendant la troisième semaine de vie chez le rat, l'animal est sevré d'une alimentation lactée riche en lipides et donc proche d'un régime cétogène pour passer à une alimentation normale à dominante glucidique (Nehlig 1999). Le cerveau du rat change donc de substrat énergétique préférentiel au moment du sevrage : au début de la vie post-natale, le métabolisme cérébral du rat dépend des composés cétoniques, puis le relais est pris par le glucose. Il existe une concordance chronologique entre ce bouleversement métabolique et les conséquences radicalement différentes d'un état de mal en terme de lésions induites et d'épileptogénèse en fonction de l'âge du rat et de son apport énergétique principal, composés cétoniques ou glucose. Nous avons souhaité explorer le rôle potentiel de ces changements métaboliques dans la vulnérabilité cérébrale à un état de mal. Nous avons donc étudié les changements dans les activités LDH et CO après un état de mal induit par Lithium-Pilocarpine, en fonction de l'âge de survenue de cet état de mal.

1.4.1.3. Conséquences du statut métabolique au moment de l'état de mal: régime cétogène et neuroprotection

Après avoir étudié les conséquences d'un état de mal induit par Lithium-Pilocarpine sur la maturation du métabolisme énergétique cérébral, nous avons voulu, à l'inverse, observer les modifications des caractéristiques de ce modèle d'épilepsie induites par un statut métabolique différent au moment de l'état de mal. Nous savons que le potentiel épiléptogène d'un état de mal induit par Lithium-Pilocarpine est moindre chez les animaux en voie de développement par rapport aux adultes. Il nous a paru intéressant de replacer, avec un régime cétogène, les rats adultes dans des conditions métaboliques énergétiques proches de celles des animaux immatures au moment de l'état de mal afin de tester cette stratégie de neuroprotection.

Pour tester cette hypothèse de neuroprotection conférée par le régime cétogène, nous avons comparé les caractéristiques de l'épilepsie secondaire ainsi que les dommages histologiques après état de mal induit par lithium-pilocarpine chez de jeunes rats adultes nourris avec un régime glucidique ou cétogène. Afin d'apporter des arguments dans la controverse de la littérature au sujet du rôle éventuellement protecteur d'une restriction calorique nous avons également constitué deux groupes de rats nourris avec des régimes hypocaloriques glucidique et cétogène (Kossoff 2004).

1.4.2. Métabolisme énergétique et crise d'épilepsie : effet anti-épiléptogène du régime cétogène?

Les précédentes expérimentations concernent un modèle chronique d'épilepsie. Il nous a paru nécessaire de tester également le potentiel anti-convulsivant des différents régimes proposés. L'injection intraveineuse continue de PTZ a déjà été utilisée pour étudier le seuil clinique des crises chez des rats nourris par régime cétogène (Bough, et al. 2000a,b, Nylen, et al. 2005) ou hypocalorique (Bough, et al. 1999b, Eagles, et al. 2003). Nous avons choisi d'utiliser cette modalité d'administration continue de pentylènetétrazole afin de disposer d'une gamme continue de doses. Dans les précédentes études, seules les caractéristiques cliniques ont été utilisées pour déterminer les seuils de sensibilité au PTZ. Afin de déterminer le plus précisément possible ces différences, notre travail a d'abord porté sur la caractérisation clinique et électroencéphalographique des crises induites par l'injection intraveineuse continue de PTZ chez le rat. Nous avons comparé les seuils pour les différents types de crises induits par le PTZ entre quatre groupes d'animaux nourris dans les mêmes conditions que pour l'étude dans le modèle Lithium-Pilocarpine: régimes normocaloriques glucidique ou cétogène, régimes hypocaloriques glucidique ou cétogène.

Deuxième section : protocoles expérimentaux

2.1. Animaux

2.1.1. Provenance – reproduction

Toutes les études ont été réalisées sur des rats Sprague-Dawley. Les rats adultes, âgés de deux à trois mois, sont issus du centre d'élevage René Janvier (Le Genest-St-Isle). Les rats immatures sont issus de l'accouplement dans notre animalerie de huit femelles et quatre mâles provenant du même élevage. Les animaux sont mis en accouplement pendant cinq jours, un mâle avec deux femelles. Le jour de naissance des rats est compté P0. Les portées sont réduites à dix animaux pour l'homogénéité des conditions nutritionnelles. Tous les animaux sont maintenus dans des conditions standards d'élevage: alternance jour/nuit d'une période de 24 heures, durée égale de 12 heures des phases nocturnes et diurnes (lumière allumée : 7h – 19h). Les rats utilisés sont des animaux des deux sexes pour les animaux en développement, mais seulement des mâles pour les animaux adultes afin d'éviter les variations de métabolisme énergétique secondaires au cycle menstruel des femelles (Nehlig, et al. 1985).

2.1.2. Régimes alimentaires

Ces régimes ont été utilisés pour les études de neuroprotection dans le modèle d'épilepsie induit par Lithium-Pilocarpine et d'effet anti-convulsivant dans le modèle au de crises induites par pentylènetetrazole.

Les animaux immatures sont nourris exclusivement par la mère jusqu'à P15 et sont spontanément sevrés à P21. Les animaux adultes disposent de nourriture et d'eau *ad libitum* dans les conditions standard d'élevage.

Quatre types de régime contrôlés ont été utilisés: normocalorique glucidique (NC), hypocalorique glucidique (HC), normocalorique cétogène (NK) et hypocalorique cétogène (HK). Pour éviter les confusions, les abréviations concernant le type d'alimentation sont celles des publications en langue anglaise. L'eau est proposée *ad libitum*. Afin de contrôler l'apport énergétique, les animaux sont placés dans des cages individuelles et nourris chaque matin en fonction de leur poids. Lorsqu'une perte de poids survient lors de l'introduction du régime, l'apport calorique est calculé sur le poids de base.

Les animaux maintenus aux régimes normocaloriques reçoivent une ration calorique couvrant les besoins nutritionnels de 0.3 kcal/g par jour (Rogers 1979). Les animaux aux régimes hypocaloriques ont une ration restreinte de 15%. L'alimentation glucidique est un aliment standard de composition certifiée pour l'élevage des rats UAR A04C (UAR, Villemoisson-sur-Orge, France). Sa composition est en proportion de l'apport calorique de 9,3% de lipides, 69,4% de glucides et 21,3% de protéines. Pour les régimes cétogènes, avons utilisé une composition pharmaceutique pour sa facilité de conservation et sa reproductibilité: Ketocal® (Nutricia, North America, Gaithersburg, MD, U.S.A.). Cette préparation est caractérisée par une composition en pourcentage de calories apportées de 90% de lipides, 1,6% de glucides et 8,3% de protéines, soit un ratio pondéral lipides/glucides+protéines de 4/1. Pour le régime cétogène, l'apport lipidique est constitué exclusivement de triglycérides à longues chaînes. Quel que soit le régime contrôlé, il est débuté à P50 après un jeûne d'une nuit. Le régime est maintenu au moins 21 jours avant les protocoles expérimentaux, pour avoir atteint le maximum d'efficacité potentielle, comme cela a été montré pour les régimes cétogènes (Appleton et DeVivo 1974, Bough et Eagles 1999, Bough, Yao et Eagles 2000b).

2.2. Modèles animaux: protocole expérimentaux

2.2.1. Le modèle Lithium-Pilocarpine

La veille de l'état de mal, on injecte par voie intra-péritonéale à tous les animaux, y compris aux témoins, 3 mEq/kg de chlorure de lithium. Trente minutes avant la pilocarpine, on injecte par voie sous-cutanée aux animaux de 21 jours et adultes 1 mg/kg de méthylscopolamine, afin de contrer les effets cholinergiques périphériques. L'état de mal est induit par l'administration sous-cutanée de pilocarpine à une dose connue pour induire l'état de mal chez tous les animaux soit 25 mg/kg pour les adultes, 30 mg/kg pour les animaux de 21 jours, 60 mg/kg pour les animaux de 10 jours (Hirsch, et al.1992).

Pour les trois groupes d'âge, l'état de mal est retenu sur des critères comportementaux (Turski, et al. 1983; Cavalheiro, et al. 1987; Hirsch, et al. 1992; Persinger et Bradley 1988).

Au bout de deux heures, les rats adultes bénéficient d'une injection de 0.5 mg/kg de diazepam. Chez les animaux, la température corporelle est surveillée. On lutte contre l'hyperthermie induite par l'état de mal chez les animaux adultes par de simples moyens physiques : température ambiante de 10°C après 2 h d'état de mal ce qui permet de diminuer sensiblement la mortalité. A l'inverse, les animaux de 10 jours, séparés de leur mère pendant

l'état de mal doivent être réchauffés sur une couverture chauffante. Quant aux animaux de 21 jours, ils ne présentent pas de dysrégulation thermique. Les rats adultes bénéficient le soir et le lendemain de l'état de mal de soins adaptés: hydratation orale ou par injection de sérum salé sous-cutané, alimentation orale à la pipette. Les rats plus jeunes ne nécessitent pas ces soins puisqu'ils sont prodigués par leur mère.

Les animaux des groupes témoins reçoivent une injection intra-péritonéale de 3 mEq/kg de chlorure de lithium et des volumes sous-cutanés de sérum physiologique équivalents à ceux de méthylscopolamine, de pilocarpine et de diazepam reçus par les animaux subissant l'état de mal.

2.2.2. Modèle de crises induites par le pentylènetétrazole

Après cathétérisme d'une veine de la queue avec un cathéter de 24 Gauge, une solution préparée extemporanément de PTZ est injectée par voie intra-veineuse continue. La solution est préparée à une concentration de 20 mg/ml PTZ et perfusée à un débit de 6 ml/h. Les animaux sont placés dans des enceintes où ils sont libres de leurs mouvements. On observe successivement un arrêt de l'activité, puis des myoclonies, puis enfin une crise clonique puis tonique. Les seuils pour les différentes manifestations cliniques observées sont déterminées en prenant en compte le comportement de l'animal et les manifestations motrices. Les seuils EEG sont déterminés indépendamment. L'injection de PTZ est arrêtée dès la survenue d'une crise clonique, pour tenter d'éviter la survenue d'une crise tonique souvent mortelle. L'observation et l'enregistrement EEG de l'animal sont poursuivis au moins 15 minutes après l'arrêt de la perfusion. A la fin de l'expérimentation, les animaux sont sacrifiés par injection d'une dose létale de barbiturique.

2.3. Electroencéphalographie

Pour la réalisation d'enregistrements électroencéphalographiques, cinq électrodes épidermiques sont implantées chirurgicalement au moins une semaine avant l'expérimentation chez les animaux anesthésiés par voie intra-péritonéale avec une association ketamine 37 mg/kg (Imalgene 1000 ®, Merial, Lyon, France) et xylazine 5.5 mg/kg (Rompun ®, Bayer, Leverkusen, Germany). Les animaux reçoivent une injection intra-musculaire systématique d'antibiotique: benzylpenicilline 60000 unités (Extencilline®) après la chirurgie. Les enregistrements électroencéphalographiques sont réalisés grâce à un système numérisé (Deltamed). La fréquence d'échantillonnage est de 256 Hz, et seul un filtre anti-repliement est utilisé pour

l'acquisition. Les électroencéphalogrammes sont analysés visuellement, puis confrontés aux observations collectées lors de l'observation du déroulement des crises.

2.4. Détermination des taux sanguins de glucose et de β -hydroxybutyrate

Afin de déterminer le taux de glucose et de β -hydroxybutyrate circulants, nous avons utilisés des micro-méthodes ne nécessitant qu'une goutte de sang prélevé pour chaque dosage. Nous avons utilisé pour ces dosages le lecteur de glycémie Accu-Chek® (Roche Diagnostics, Meylan, France) et pour le β -hydroxybutyrate les bandelettes β -ketone strip test sur un lecteur Medisense® Optium™ Xceed™. Avant d'utiliser ces deux techniques rapides et techniquement aisées avec un prélèvement minimal de sang, nous avons validé sur une série d'animaux la concordance des valeurs obtenues avec celles issues des techniques classiques spectrophotométriques sur sang total de rat anesthésié recueilli après décapitation.

2.5. Histologie

Pour les études concernant la maturation, les coupes histologiques de 20 μm sont réalisées dans un cryostat sur un plan coronal au niveau de 9 plans de coupes présélectionnés sur l'atlas de Paxinos et Watson (Paxinos et Watson 1982) pour les animaux adultes et sur celui de Sherwood et Timiras (Sherwood et Timiras 1970) pour les animaux en développement. Pour l'expérimentation concernant le régime cétogène tout le cerveau est prélevé en coupes coronales de 30 μm espacées de 120 μm . Les lames sont séchées à température ambiante pendant une heure puis replacées dans un conditionnement hermétique à -30°C .

Les lames sont colorées à la thionine. Pour les comptages neuronaux, nous avons utilisé une technique bidimensionnelle standardisée. Les images des coupes histologiques sont numérisées à un grossissement de 200 fois. Pour chaque structure, la distribution autour de la moyenne de la taille des neurones est déterminée, ainsi que la densité de coloration des noyaux. La structure est ensuite visuellement délimitée, et le nombre de neurones estimé par une approche de type comptage de grains (logiciel MCID analysis). Cette technique semi-automatique permet d'éviter le caractère subjectif du comptage visuel.

2.6. Histo-enzymologie: lactate déshydrogénase et cytochrome oxydase

Pour chaque technique, toutes les lames sont traitées le même jour dans les mêmes solutions préparées extemporanément. Pour les deux enzymes, il s'agit de méthodes histo-chimiques en excès de substrat. Une réaction d'oxydo-réduction conduit à la précipitation, au niveau des

sites enzymatiques sur les coupes histologiques, d'un chromogène. La densité optique est lue au niveau de 35 structures présélectionnées grâce à un système d'analyse d'image Densirag (Biocom) à un grossissement de 10 fois. Le repérage des structures est direct ou guidé par les coupes adjacentes colorées pour l'histologie. La lecture de la densité optique des différentes structures est réalisée de manière bilatérale, la valeur retenue pour chaque animal est la moyenne des deux valeurs. Pour la CO, la relation entre la densité optique du produit de la réaction sur des coupes histologiques et l'activité de l'enzyme mesurée par spectrophotométrie est linéaire (Dariett, et al. 1986, Gonzales-Lima et Garrosa 1989). La mesure spectrophotométrique de l'activité de la LDH est également directement corrélée aux mesures de densité optique (Borowski et Collins 1989).

2.6.1.1. Cytochrome oxydase

La révélation de l'activité de la CO est réalisée selon la technique décrite par Wong-Riley modifiée par Dariett *et al.* (Wong-Riley 1989, Dariett, et al. 1986). Le principe est l'oxydation de la diaminobenzidine par un transfert d'électrons sur le cytochrome c. Le transporteur d'électrons est l'oxygène du milieu d'incubation. La diaminobenzidine ainsi oxydée polymérise et précipite sous forme d'un composé ocre. Les lames sont décongelées 4 h avant utilisation, puis post-fixées dans du paraformaldéhyde 4% pendant 2 heures à 4°C et rincées dans du tampon phosphate 0,1M. L'incubation a lieu à l'obscurité pendant deux heures dans une étuve à 38°C dans un milieu composé de tampon phosphate 0,1 M à pH 7,6 afin d'optimiser la coloration (Gonzales-Lima et Garrosa 1989); tétrachlorure de 3,3' diaminobenzidine 0,05% (Sigma); cytochrome c 0,25 mg/ml (Sigma). Les lames sont rincées très rapidement dans de l'eau distillée à température ambiante et déshydratées dans des bains d'éthanol de concentration croissante suivis de LMR, puis montées à l'aide d'histolaque (Labo Moderne, Paris).

2.6.1.2. Lactate déshydrogénase

Nous avons utilisé le protocole expérimental mis au point par Jacobsen, modifié par Borowsky et Collins (Jacobsen 1969, Borowski et Collins 1989). L'oxydation du lactate en excès permet la réduction du NAD. Le NADH réduit à son tour le nitrobleu de tétrazolium, ce qui conduit à la formation de formazan bleu. Le transporteur d'électrons est le phénazine méthosulfate. Le polyvinyl alcool empêche la diffusion de l'enzyme dans le milieu d'incubation. Les coupes sont décongelées 4 h avant utilisation puis incubées simultanément

dans le même milieu réactionnel pendant 5 min à 37°C. Le milieu est composé de tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,0; DL-lactate 100 mM (Sigma); NAD 4 mM (NAD grad II, Boehringer); nitrobleu de tétrazolium 4,9 mM (Boehringer); phénazine méthosulfate 0,33 mM (Sigma); polyvinyl alcool 10% (Sigma). Les lames sont rincées, puis fixées dans le paraformaldéhyde 10%. Elles sont ensuite montées à l'aide d'aquovitrex (Farmitalia, Milan) après rinçage à l'eau distillée.

Troisième section : Résultats expérimentaux

3.1. Publication n°1 : Maturation des voies de glycolyse aéro et anaérobie au niveau cérébral

Ce travail a été mené sur 40 rats sacrifiés à P10, P21, P35 et à l'âge adulte. L'étude histoenzymologique semi-quantitative sur 35 régions anatomiques et sept structures hippocampiques.

Pour l'étude concernant la maturation, Les animaux qui ont subi l'état de mal à P10, P21 au à l'âge adulte sont sacrifiés à trois temps : 4 h et 24 h et 14 j après le début de l'état de mal. Un seul groupe de rats témoins est nécessaire pour les animaux adultes, il est constitué d'animaux sacrifiés 4 h, 24 h et 14 jours après l'injection de sérum physiologique contemporaine de l'injection de pilocarpine des animaux subissant l'état de mal. Deux groupes de témoins sont constitués pour les animaux P21 : le premier est composé des animaux sacrifiés 4 h (P21) et 24 h (P22), le deuxième des animaux sacrifiés après 14 jours (P35). De même, deux groupes de rats témoins sont réalisés pour les animaux P10 : un groupe à 4 h (P10) et 24 h (P11), l'autre à 14 jours (P24). Les animaux sont décapités après administration de pentobarbital intra-péritonéal. Le cerveau est immédiatement extrait de la boîte crânienne et congelé dans de l'isopentane à -30°C.

3.1.1. Profils de maturation de la CO et de la LDH

3.1.1.1. Maturation de la cytochrome oxydase

Quel que soit l'âge des animaux, les niveaux d'activité maximale sont toujours retrouvées au niveau des cortex occipital et pariétal, du thalamus ventro-latéral, des structures grises cérébelleuses (noyaux et cortex) et de la couche des cellules pyramidales de CA3. Les niveaux minimaux d'activité CO sont retrouvés dans la substance blanche au niveau du genou du corps calleux, et également dans le cortex cingulaire, le septum et le noyau caudé. Au sein d'un même groupe d'âge, l'activité de la CO est très hétérogène selon les structures concernées avec un rapport entre la valeur de la structure présentant l'activité maximale et celle présentant la plus basse. Ce rapport varie entre 3,7 et 7,1 en fonction de l'âge. Les animaux adultes montrent le rapport le plus élevé (Figure 8).

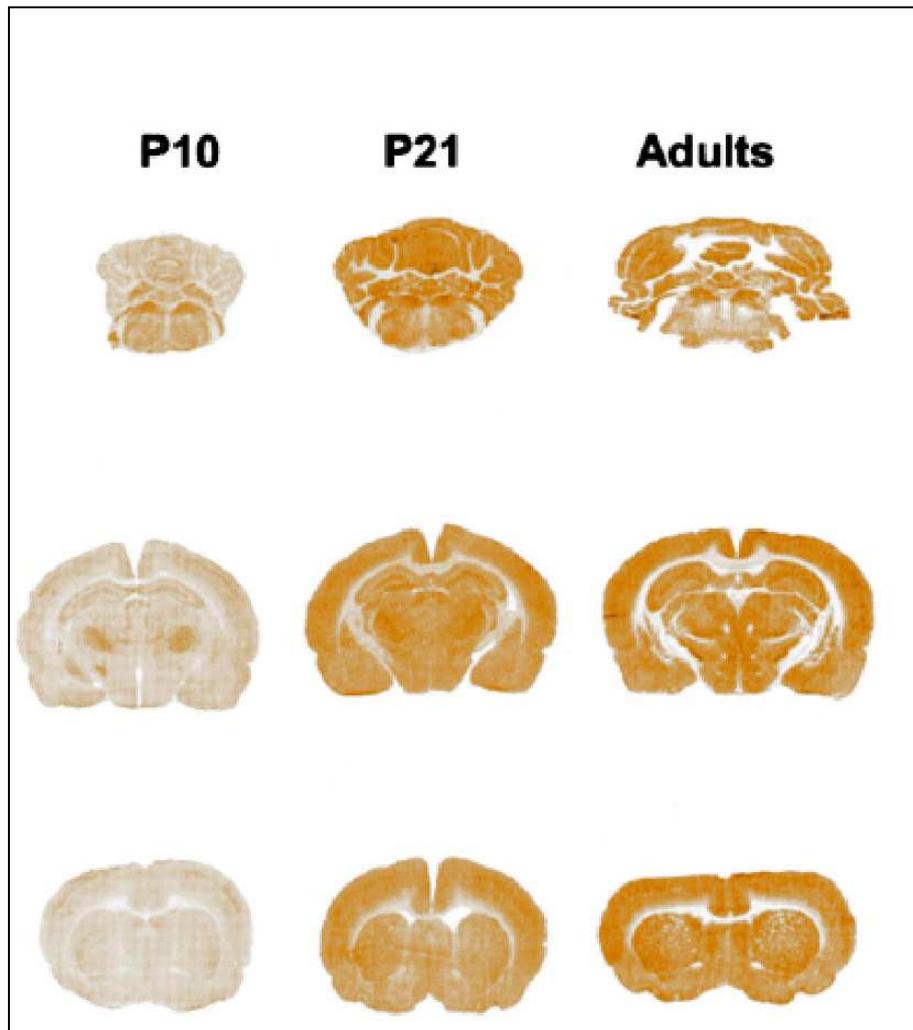


Figure 8 : Maturation régionale de la cytochrome oxydase

Les niveaux de coupe correspondent de haut en bas à une coupe postérieure, passant par le cervelet, une coupe médiane qui met en évidence en particulier l'hippocampe, le thalamus et l'hypothalamus, cortex entorhinal, une coupe antérieure, où l'on distingue les noyaux caudés et le cortex frontal.

Plusieurs profils de maturation sont observés. Les structures les plus postérieures, dont les structures rhombencéphaliques, ont une capacité oxydative maximale dès le stade P10/11. Toutes les autres structures montrent une augmentation d'activité CO en fonction de l'âge, avec cependant une cinétique de maturation plus ou moins rapide. Le maximum d'activité CO est atteint dès P21 dans la plupart des structures dont les cortex parahippocampiques. Ce maximum est atteint à P35 dans de plusieurs cortex dont le cortex temporal, ou seulement à l'âge adulte dans l'amygdale médiale (Figure 9).

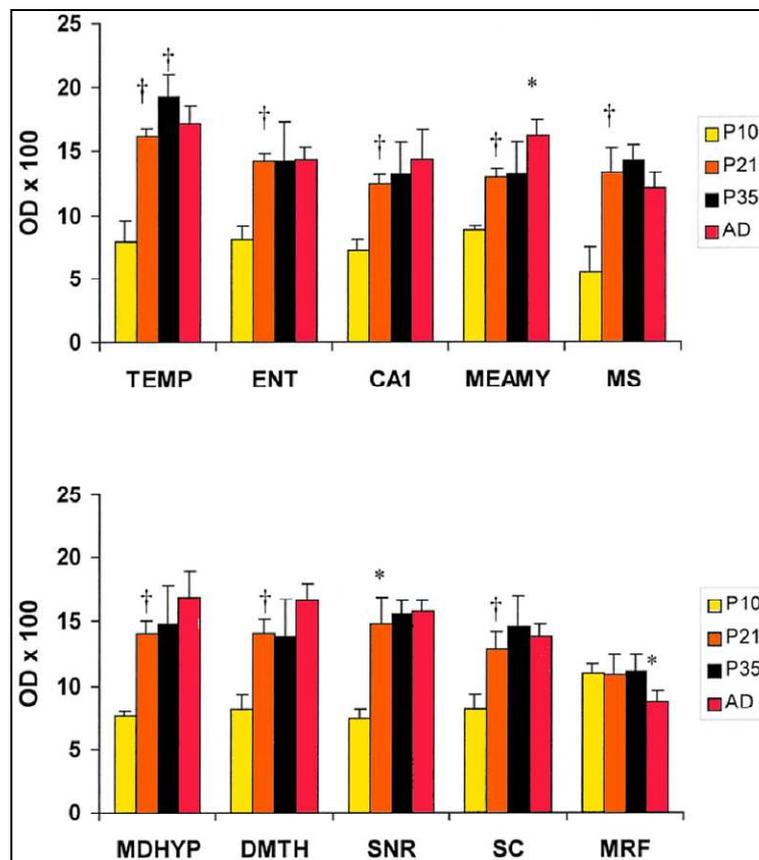


Figure 9 : Profils de maturation de la cytochrome oxydase

L'activité maximale de CO est atteinte dès P21 dans la plupart des structures (TEMP: cortex temporal, ENT: cortex entorhinal, CA1: corne d'Ammon 1, MEAMY: amygdale médiale, MS: septum, MDHYP: hypothalamus médio-dorsal, DMTH: thalamus dorso-médial, SNR: substance noire réticulée, SC: colliculus supérieur, FRM: formation réticulée médullaire).

3.1.1.2. Maturation de la lactate déshydrogénase

L'activité de la LDH est plus homogène au niveau des différentes structures histologiques cérébrales. Les différences observées sont au maximum d'un facteur 2,4 entre les structures au même âge. L'activité maximale est toujours retrouvée au niveau du genou du corps calleux. Les noyaux interposés du cervelet, les formations réticulées médullaires et pontines ont, quel que soit le stade de développement, toujours une activité LDH parmi les plus basses (Figure 10).

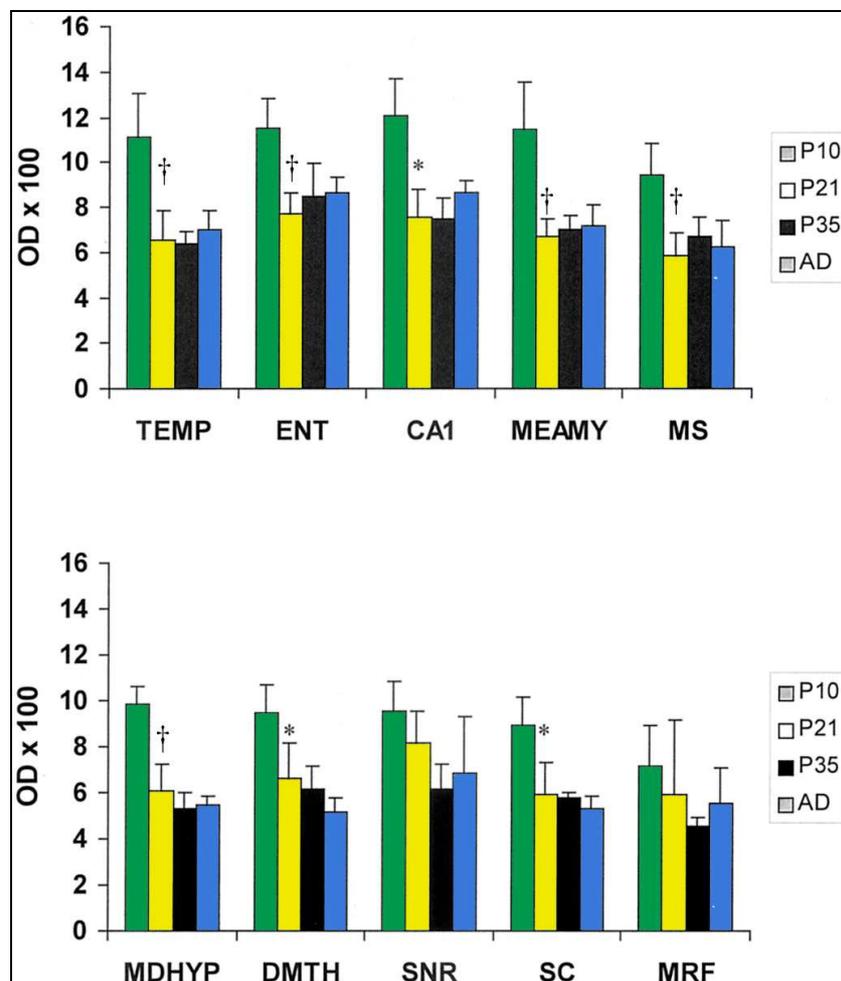


Figure 10: Profils de maturation de la cytochrome oxydase

Dans la plupart des structures, l'activité lactate déshydrogénase est maximale l'âge le plus précoce (TEMP: cortex temporal, ENT: cortex entorhinal, CA1: corne d'Ammon 1, MEAMY: amygdale médiale, MS: septum, MDHYP: hypothalamus médio-dorsal, DMTH: thalamus dorso-médial, SNR: substance noire réticulée, SC: colliculus supérieur, FRM: formation réticulée médullaire).

3.1.2. Discussion

Les méthodes en œuvre pour révéler l'activité de la LDH et de La CO sont des méthodes semi-quantitatives qui ne permettent pas de comparaison entre les densités optiques mesurées pour les deux enzymes à un temps donné. Par ailleurs, l'activité enzymatique révélée est une activité maximale potentielle, en excès de substrat, ce qui ne correspond pas à la situation physiologique. Toutefois ces techniques ont été largement utilisées afin d'explorer les variations du métabolisme énergétique dans des situations physiologiques (Horton et Hubel 1981, Bilger et Nehlig 1991, Hovda, et al. 1992) ou pathologiques (Hovda et Villablanca 1998, Villablanca, 1999, Nobrega, et al. 1993). La définition obtenue par marquage de l'activité CO est suffisante pour les études cytologiques et ultrastructurales (Wong-Riley 1989). Une corrélation directe entre l'activité CO et l'utilisation cérébrale de glucose est démontrée chez le rat (Borowski et Collins 1989, Klein, et al. 1986).

Nos résultats concordent avec ceux de la littérature pour la maturation des activités enzymatiques étudiés. **L'activité de la CO** est maximale dès P10 dans certaines structures comme la formation réticulée médullaire ou les noyaux interposés du cervelet. Ce résultat confirme le haut potentiel glycolytique précoce des structures cérébrales les plus postérieures (Leong et Clark, 1984). L'augmentation continue de l'activité CO dans la plupart des structures limbiques diencephaliques et mésencéphaliques est parallèle à l'augmentation des taux d'utilisation cérébrale locale de glucose qui peuvent être mesurés par autoradiographie quantitative au 2-désoxyglucose-(¹⁴C) (Nehlig et Pereira de Vasconcelos 1993, Klee et Sokoloff 1967, Bilger et Nehlig 1991). A l'inverse, l'activité CO dans la substance blanche est toujours la valeur la plus basse mesurée à un stade de développement donné, ce qui concorde avec la pauvreté en mitochondries des fibres axonales qui la constituent.

On observe au niveau de circuits anatomo-fonctionnels impliqués en particulier dans les voies sensorielles un profil de maturation de l'activité CO parallèle à la maturation fonctionnelle. Par exemple, le colliculus inférieur, le noyau genouillé médial et le cortex auditif primaire ont simultanément un maximum d'activité oxydative potentielle vers P21 alors que la fonction auditive se développe et que l'on observe des augmentations d'UCLG dans ces structures. De la même façon, le maximum d'activité CO observé dans les deux structures visuelles étudiées, cortex visuel et colliculus supérieur, correspondent à l'acquisition de la fonction visuelle. Ces données suggèrent la nécessité de l'acquisition d'un équipement enzymatique cérébral mature pour le développement des fonctions neurologiques (Leong et Clark 1984).

L'activité LDH est maximale entre la deuxième et la troisième semaine après la naissance, selon l'isoenzyme considérée. (Takagaki 1974, Booth, et al. 1980, Leong et Clark 1984, Bilger et Nehlig 1991, Almeida, et al. 1995). La diminution d'activité que nous observons entre P10 et P21 est contemporaine de la maturation de la forme H4 neuronale de la LDH et de l'évolution vers une prédominance du métabolisme aérobie pour le glucose (Bonavita, et al. 1962, Bonavita, et al. 1963, Bonavita, et al. 1964, Ford 1973). L'absence de variation de l'activité enzymatique de LDH mesurée après P21 est cohérente avec l'évolution ontogénique de la composition isoenzymatique de cette enzyme qui est atteinte dès ce stade (Bonavita, et al. 1962, Booth, et al. 1980).

3.1.3. Conclusion

En ce qui concerne le métabolisme énergétique, l'hippocampe comme les cortex parahippocampiques atteignent un maximum d'activité oxydasique très rapidement dans les trois premières semaines de vie post-natale chez le rat. Ce potentiel de la cytochrome oxydase est dès P21 comparable à celui des animaux adultes dans les structures impliquées dans l'épileptogénèse, en dehors de l'amygdale médiale où ce maximum est atteint à P35.

3.2. Publication n°1 : Conséquences d'un état de mal épileptique précoce induit par Lithium-Pilocarpine sur la maturation du métabolisme énergétique cérébral

Ce travail a été mené sur 48 rats. Les animaux de l'étude précédente, menée simultanément, constituent les groupes témoins. Les activités enzymatiques CO et LDH ont été déterminées pour les animaux sacrifiés 4 h, 24 h et 14 jours après un état de mal induit par le Lithium-Pilocarpine chez des animaux de P10, P21 et adultes.

3.2.1. Résultats

3.2.1.1. Conséquences de l'état de mal sur la cytochrome oxydase (Figure 11)

Chez les animaux qui subissent l'état de mal à P10, on observe une diminution d'activité à la 4^{ème} heure dans les structures amygdaliennes (8% à 14%) et dans le thalamus ventro-latéral (18%). Aucune modification significative d'activité n'est visible 24 h ou 14 jours après la pilocarpine par rapport aux groupes témoins. Chez les animaux soumis à l'état de mal à P21, peu de variations significatives d'activité sont documentées. On retrouve toutefois, comme dans le groupe d'animaux adultes, une diminution d'activité dans l'amygdale médiale à la 4^{ème} heure (-12%) ainsi que dans CA3 de l'hippocampe à la 24^{ème} heure (-21%). Les niveaux d'activité enzymatique sont similaires à ceux du groupe témoin dans toutes les structures 14 jours après l'état de mal épileptique.

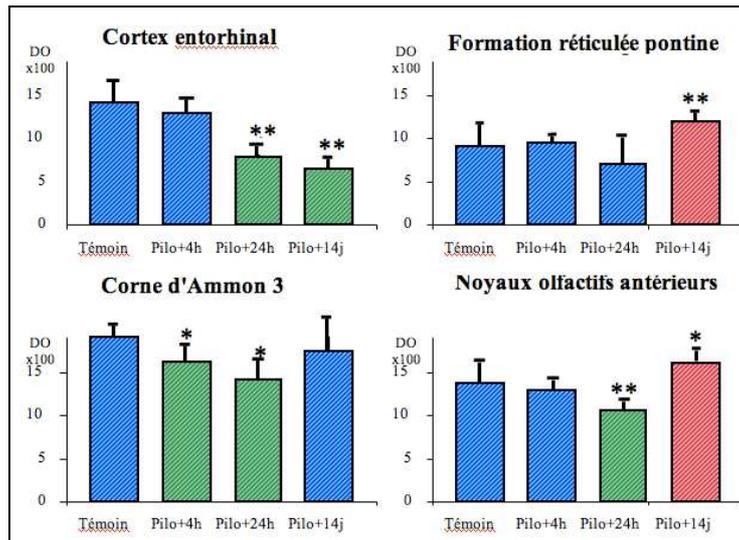


Figure 11: Conséquences de l'état de mal induit par Lithium-Pilocarpine sur l'activité cytochrome oxydase chez l'animal adulte

Certaines structures très lésées comme le cortex entorhinal sont le siège d'un effondrement de l'activité CO dès la 24^{ème} heure, et qui persiste à J14. D'autres structures lésées comme CA3 ne montrent qu'une diminution transitoire de l'activité CO. Une augmentation paradoxale d'activité à 14 jours est objectivée dans des structures comme les noyaux olfactifs antérieurs et la formation réticulée pontine.

Chez les animaux adultes, certaines structures montrent précocement une diminution d'activité. Quatre heures après l'état de mal, on observe une diminution d'activité par rapport au groupe témoin de 13 à 16% dans CA3, l'amygdale médiale, tous les noyaux thalamiques et la substance noire réticulée. A la 24^{ème} heure, la diminution d'activité est significative dans le cortex entorhinal, CA3, l'amygdale médiale et la substance noire réticulée. Au CO qui persiste alors le plus souvent jusqu'à la fin de la phase de latence. 14^{ème} jour, la diminution d'activité CO persiste en particulier dans le cortex entorhinal. D'autres structures dans lesquelles aucune modification précoce montrent paradoxalement une augmentation secondaire d'activité entre 12 et 28% par rapport aux animaux témoins. Il s'agit de la formation réticulée pontine les colliculi supérieur et inférieur, le noyau caudé et le cortex visuel.

Afin de préciser les variations d'activité au niveau des structures limbiques, nous avons relu les coupes histologiques à un grossissement permettant d'individualiser les différentes couches de l'hippocampe (Figure 12). Nous nous sommes intéressés à l'aire 1 de la corne d'Ammon et au gyrus denté. Cette méthode permet de mettre en évidence, chez les animaux adultes, une diminution significative de l'activité de la CO à 4 h dans la couche des cellules pyramidales de l'aire 1 de la corne d'Ammon (-23%), ainsi qu'une augmentation au

niveau du stratum radiatum à 14 j (+11%). Dans le gyrus dentelé, une diminution d'activité au niveau de la couche moléculaire interne (-19%) est mise en évidence 14 jours après l'état de mal. Ces modifications ne sont pas observées chez les animaux immatures.

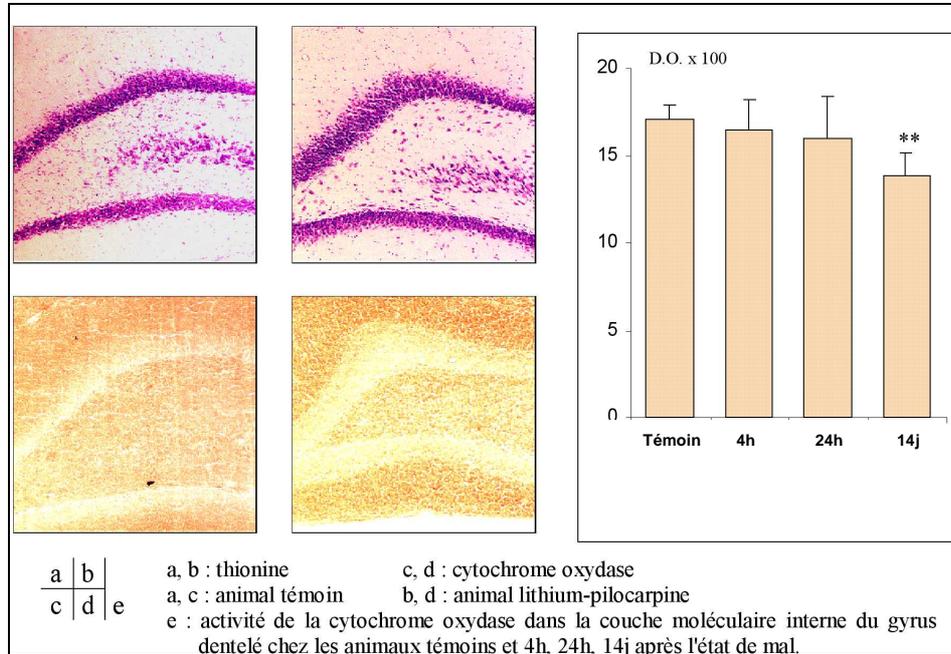


Figure 12 : Activité de la cytochrome oxydase dans l'hippocampe à la fin de la phase de latence

Quatorze jours après l'état de mal, on observe une diminution significative d'activité de la cytochrome oxydase dans la couche moléculaire interne du gyrus dentelé qui est le premier relais synaptique du cortex entorhinal lésé.

3.2.1.2. Conséquences de l'état de mal sur lactate deshydrogénase

Dans le groupe d'animaux adultes, on n'observe aucune modification d'activité à la 4^{ème} heure après précoce après l'état de mal. A la 24^{ème} heure, 3 structures sont concernées par une augmentation d'activité entre 9 et 20% : le colliculus supérieur, le cortex piriforme et le thalamus dorso-médial. Au 14^{ème} jour, le cortex entorhinal est le siège d'une diminution de l'activité de plus de moitié (-62%) alors qu'une diminution plus modérée est observée dans le cortex sensorimoteur (26%). L'activité de la LDH n'est modifiée dans aucune autre structure par rapport aux animaux témoins.

3.2.2. Discussion

3.2.2.1. *Activité CO aux phases précoces*

Les modifications d'activité CO aux 4^{ème} et 24^{ème} heures après l'état de mal sont limitées : ce sont des diminutions d'activité qui intéressent principalement certaines structures hippocampiques, amygdaliennes, thalamiques ainsi que les cortex parahippocampiques. Ces modifications sont d'autant plus limitées que l'animal est jeune lors de l'état de mal.

Aucune lésion n'est visible chez les animaux soumis à un état de mal à P10 même dans l'amygdale médiale et les noyaux thalamiques qui sont les régions dans lesquelles la diminution d'activité CO est la plus importante. Cependant la vulnérabilité du thalamus à cet âge a déjà été indiquée: c'est une des seules structures marquées par Fluoro-Jade B après une état de mal induit par Lithium-Pilocarpine à P12. La capacité de récupération neuronale après une souffrance transitoire a déjà été montrée à cet âge (Pineau, et al. 1999). A P21 les régions qui sont le siège d'une diminution précoce d'activité CO ne sont pas systématiquement lésées, et les régions lésées n'ont pas systématiquement de diminution d'activité CO. Chez les animaux adultes, en revanche, toutes les régions affectées par une modification précoce du potentiel de glycolyse aérobie sont secondairement lésées, bien que comme chez les animaux plus jeunes cette diminution d'activité ne soit pas toujours retrouvée dans des régions très lésées (Fernandes, et al. 1999, Dube, et al. 2000a,b, Dube, et al. 2001a). Dans ces structures lésées pour lesquelles le potentiel d'activité CO reste précocement inchangé, on observe de la même façon un maintien de l'activité métabolique révélée par la technique au 2DG: certaines de ces structures, comme le cortex piriforme, sont des structures clés sans les mécanismes d'épileptogénèse (Roch, et al. 2002a,b).

3.2.2.2. *Activité CO à la fin de la phase de latence*

La seule diminution d'activité encore significative 14 jours après l'état de mal concerne le cortex entorhinal chez l'animal adulte et correspond à des dommages tissulaires majeurs et à un bas niveau métabolique (Figure 13) (Dube, et al. 2000b; Dube, et al 2001a). Les autres régions lésées ont retrouvé un potentiel d'activité CO comparable aux témoins, de la même façon qu'elles montrent un niveau métabolique similaire à l'échelon de la structure, ce qui traduit un relatif hypermétabolisme à l'échelon cellulaire (Dube, et al. 2000a,b; Dube, et al. 2001a).

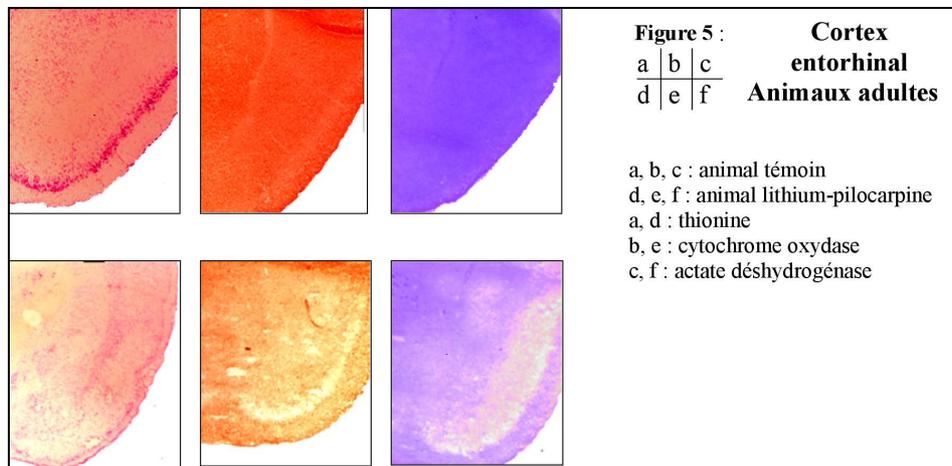


Figure 13 : Dommages neuronaux, activités cytochrome oxydase et lactate déshydrogénase dans le cortex entorhinal à la fin de la période de latence

Quatorze jours après l'état de mal, les lésions histologiques du cortex entorhinal s'accompagnent d'une forte diminution d'activité de la CO et de la LDH.

Chez les animaux adultes, on observe une activité CO significativement plus élevée dans les structures potentiellement impliquées dans des mécanismes de contrôle des crises : ganglions de la base (Garant et Gale 1987, Depaulis, et al. 1994, Deransart, et al. 1998), tronc cérébral (Cavalheiro et Turski 1986, Loscher, et al. 1987), cortex cérébelleux (Paz, et al. 1991, Miller, et al. 1993) (Figure 14).

Au niveau de l'hippocampe en particulier, on observe à la période de latence une diminution de l'activité oxydasique au niveau de la couche moléculaire interne du gyrus dentelé. Or l'activité de la CO neuronale est directement liée aux afférences fonctionnelles (Wong-Riley 1989) et la couche moléculaire interne reçoit les fibres afférentes issues du cortex entorhinal fortement lésé. Ainsi mets en évidence directement la déafférentation fonctionnelle partielle des cellules granulaires du gyrus denté qui est le point de départ du bourgeonnement des fibres moussues impliqué dans l'épileptogénèse.

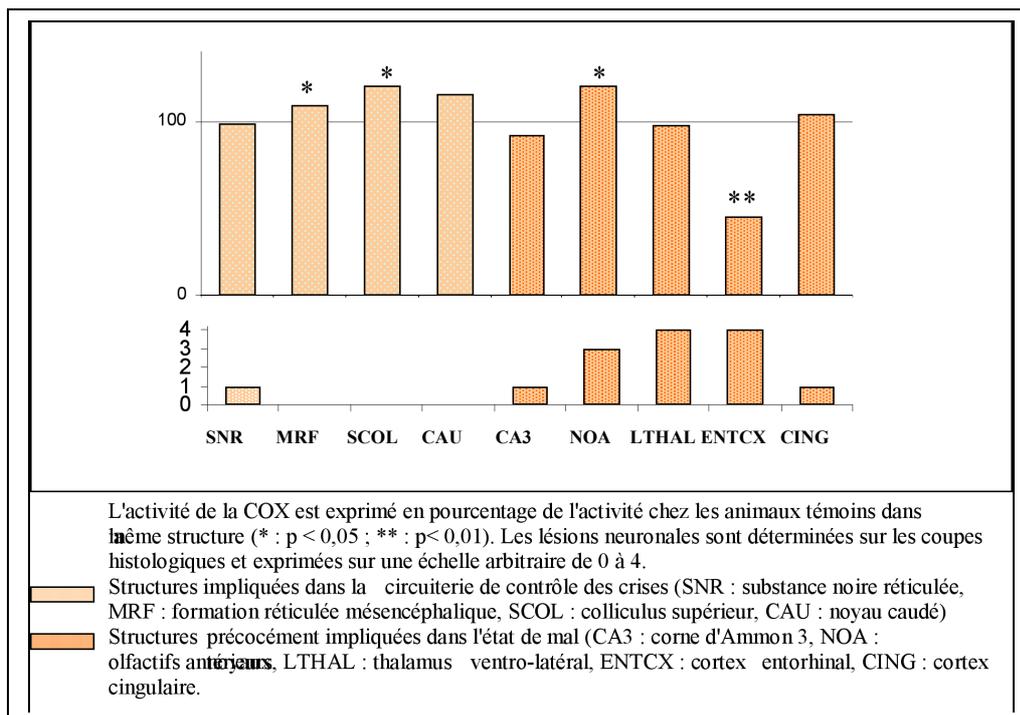


Figure 14 : Activité régionale de la cytochrome oxydase à la fin de la période de latence

Les variations du potentiel oxydatif ne sont pas toujours corrélées à l'intensité des dommages neuronaux. A la fin de la période de latence, on observe une augmentation de potentiel d'activité CO dans les structures impliquées dans le circuit de contrôle des crises.

3.2.2.3. *Modifications de l'activité LDH*

Elles sont plus modérées et moins diffuses que celles de la CO. Nous ne les avons étudiées que chez les animaux adultes. Une augmentation d'activité LDH intéresse à la 24^{ème} heure de l'état de mal des structures lésées, cortex piriforme et thalamus dorsal médian, comme une structure non lésée, le colliculus supérieur. Dans les structures qui sont le siège de lésions neuronales, il pourrait s'agir d'un mécanisme de compensation ou d'activation de la glycolyse anaérobie astrocytaire là où on peut observer une gliose réactionnelle (Magistretti et Pellerin 1996, Roch, et al. 2002a). Au niveau du colliculus supérieur, l'augmentation de l'activité LDH pourrait être le témoin, comme celle de la CO, de l'activation précoce de cette structure impliquée dans la circuiterie de contrôle des crises (Garant et Gale 1987, Depaulis, et al. 1994, Deransart, et al. 1998).

A la fin de la phase de latence, au 14^{ème} jour, l'activité LDH est diminuée dans des structures lésées, cortex entorhinal et sensorimoteur, alors qu'elle ne l'est pas dans les autres structures qui sont le siège de dommages neuronaux. Cette différence pourrait s'expliquer par une gliose réactionnelle moins importante dans les premières. L'absence de corrélation stricte entre les dommages neuronaux et le niveau d'activité métabolique des structures a déjà été montré dans le modèle Lithium-Pilocarpine. Nos résultats sont en faveur d'une préservation en partie de cette activité métabolique par la voie de la glycolyse anaérobie.

3.2.3. Conclusion

Les modifications dans les voies métaboliques énergétiques aéro ou anaérobies du glucose sont dépendantes de l'âge auquel l'animal est soumis à l'état de mal induit par Lithium-Pilocarpine. Ces modifications sont plus marquées et intéressent plus de structures chez les animaux adultes par rapport à aux animaux immatures.

A la phase aiguë (4 h et 24 h) une diminution de potentiel d'activité oxydasique est observée dans la plupart des structures secondairement lésées. A la fin de la phase de latence (14 jours), les seules modifications d'activité CO concernent les animaux soumis à l'état de mal à l'âge adulte. Il s'agit soit d'une diminution d'activité potentielle dans les structures lésées ou partiellement déafférentées, soit d'une augmentation dans les circuits de contrôle des crises.

Précocement après l'état de mal, l'activité LDH est transitoirement augmentée dans certaines structures lésées, ou également dans non lésées mais impliquées dans le circuit de contrôle des crises. A J14, l'activité LDH est diminuée dans les cortex entorhinal et sensorimoteur alors que d'autres structures plus sévèrement lésées mais siège d'une réaction gliale plus importante ne montrent pas de diminution d'activité enzymatique.

Nos résultats confirment l'existence d'un découplage métabolique dans certaines structures lésées à la fin de la période de latence du modèle Lithium-Pilocarpine.

3.3. Publication n°2 – en préparation : Régime cétogène et neuroprotection dans le modèle Lithium-Pilocarpine

Soixante rats ont été utilisés pour cette expérimentation. Dès P50, ils sont soumis à un régime alimentaire contrôlé. Quatre types de régime contrôlés ont été utilisés: normocalorique glucidique (NC), hypocalorique glucidique (HC), normocalorique cétogène (NK) et hypocalorique cétogène (HK). Les taux de glucose et de β -hydroxybutyrate sont déterminés avant l'expérimentation. Comme nous l'avons déjà montré (Raffo, et al. 2007) le régime cétogène utilisé est bien toléré et il induit une cétose significative, qu'il soit associé ou non à une restriction calorique. Le régime glucidique hypocalorique n'induit pas de cétose. Les états de mal sont induits par l'injection de pilocarpine au 21^{ème} jour de régime. Ce jour est compté J0. Dès électrodes épidurales implantées chez 4 rats de chaque groupe environ une semaine avant l'induction de l'état de mal permettent de caractériser électriquement les 8 premières heures d'état de mal. L'EEG est également enregistré pendant 1 heure à H24, puis toutes les 24 heures jusqu'à J6. Les rats sont maintenus au régime cétogène et/ou hypocalorique jusqu'à J7. A partir du 8^{ème} jour, les rats de chaque groupe reçoivent un régime glucidique ad libitum. Les animaux sont alors placés en surveillance vidéo 10h/24 pendant la période où l'animalerie est éclairée. L'analyse du comportement des animaux lors des enregistrements est faite en temps accéléré afin de déterminer la date de la première crise cliniquement visible, qui définit la phase chronique dans le modèle Lithium-Pilocarpine. Pour l'histologie, Les animaux sont sacrifiés 30 jours après le début de la phase chronique.

3.3.1. Résultats

3.3.1.1. Caractéristiques de l'état de mal

Les caractéristiques cliniques et EEG de l'état de mal sont identiques dans les différents groupes d'animaux. Les premières bouffées de pointes et pointe-ondes surviennent en moyenne à la 25^{ème} minute après l'injection de pilocarpine, alors que les animaux présentent une hyperactivité motrice entrecoupée de courtes périodes d'arrêt d'activité contemporaines

des pointe-ondes électroencéphalographiques. On observe également un comportement de mâchonnement automatique. Très rapidement, en moyenne à la 35^{ème} minute, les animaux présentent des clonies des pattes antérieures, puis des redressements correspondant à une prise de posture tonique axiale. Sur le plan EEG, on observe alors une activité de pointes recrutantes de grande amplitude. Cette activité de pointes devient continue dans les minutes qui suivent le premier redressement qui entraîne une chute de l'animal, en moyenne à la 50^{ème} minute. L'activité EEG de pointes continues persiste durant les premières heures, tout en se morcelant. Les animaux n'ont alors pas d'activité motrice organisée, ils ont perdu le tonus postural et sont parcourus de tremblements de tous le corps entrecoupés de rares myoclonies massives.

Le lendemain de l'état de mal, alors que les animaux ont retrouvé un tonus postural, ils gardent une altération comportementale, avec en particulier des difficultés de prise alimentaire. Sur le plan EEG, à la 24^{ème} heure, on observe encore des bouffées fréquentes de pointes et de pointe-ondes bilatérales sans manifestations motrices associées. Ces activités intéressent au moins 20 % du temps d'enregistrement. Deux jours après l'injection de pilocarpine, les animaux ont retrouvé un comportement alimentaire qui leur permet des apports hydriques et caloriques suffisants. Sur le plan EEG, on observe une réorganisation du tracé de fond, sur lequel on enregistre des pointes isolées encore fréquentes à la fréquence d'au moins une toutes les 5 minutes. Les jours suivants, la fréquence de ces pointes diminue progressivement pour devenir rares au 6^{ème} jour.

La mortalité à la phase aiguë de l'état de mal n'est pas chez les animaux nourris au régime cétogène ou glucidique (Figure 15). En revanche, elle est significativement plus élevée chez les animaux soumis à un régime hypocalorique par rapport aux animaux nourris avec le régime normocalorique correspondant ($p < 0,001$). La mortalité est observée le plus souvent dans les premières heures qui suivent l'injection de pilocarpine, à la suite de crises toniques prolongées. On n'observe plus de mortalité après la 72^{ème} heure.

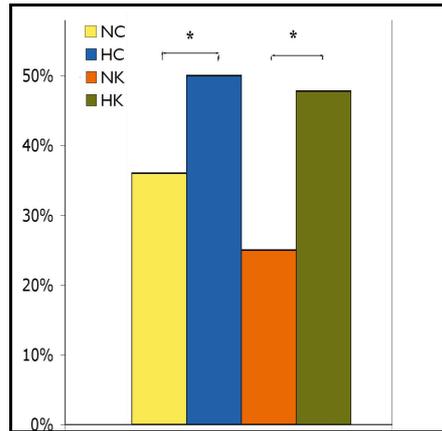


Figure 15 : Mortalité induite par l'état de mal

La mortalité aigüe après un état de mal induit par Lithium-Pilocarpine est significativement plus élevée dans les groupes d'animaux qui sont soumis à une restriction calorique ($p < 0,001$)*

3.3.1.2. Incidence et latence de l'épilepsie (figure 16)

Quel que soit le régime alimentaire au moment de l'état de mal, quasiment tous les animaux deviennent épileptiques après une phase cliniquement silencieuse. Bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative, on observe que les trois seuls animaux qui n'ont pas présenté de crises récurrentes spontanées au bout de 70 jours d'observation étaient nourris au régime cétogène lors de l'état de mal (NK=2, HK=1). Les caractéristiques des crises spontanées ne diffèrent pas selon les groupes. Il s'agit de crises limbiques qui évoluent vers une généralisation. La latence moyenne de survenue de la première crise clinique chez les animaux devenus épileptiques est de 20 jours, mais elle est très largement distribuée (7 à 50 jours). Cette latence n'est pas statistiquement différente entre les groupes de rats soumis aux différents régimes.

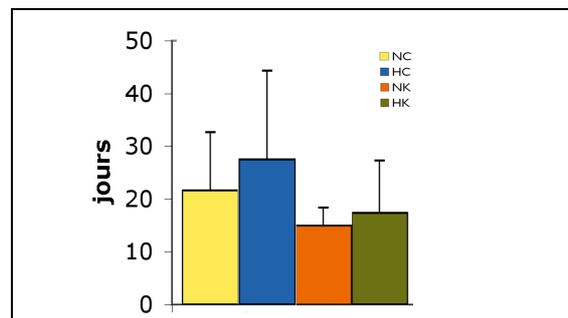


Figure 16 : Latence d'apparition de l'épilepsie

Quel que soit le régime des animaux lors de l'état de mal induit par Lithium-Pilocarpine, on n'observe pas de différence significative dans la latence d'apparition de crises spontanées récurrentes.

3.3.1.3. Histologie

La densité cellulaire est mesurée dans 5 des structures les plus lésées du modèle, et impliquées dans les remaniements qui sous-tendent l'épileptogénèse CA1, CA3, hile du gyrus denté de l'hippocampe, cortex entorhinal, cortex piriforme.

Au niveau des cortex, quel que soit le groupe d'animaux considéré, on observe une quasi destruction des couches II et III. Le nombre de neurones résiduels n'est pas différent selon le régime des animaux.

Au niveau de l'hippocampe, on observe une différence statistiquement très significative entre les densités neuronales des structures étudiées (ANOVA multivariée : $p < 0,001$) (Figure 17). Dans toutes les régions hippocampiques étudiées, la densité neuronale est plus élevée quelle que soit la stratégie de neuroprotection testée : restriction calorique de 15%, régime cétogène, ou association des deux. Par rapport au groupe NC, considéré comme groupe non protégé, la neuroprotection est statistiquement significative au niveau du hile du gyrus denté (ANOVA : $p = 0,039$) pour HC (Fisher : $p = 0,036$) et NK ($p = 0,009$). De la même façon, dans CA1 (ANOVA : $p = 0,001$) pour HC (Fisher : $p = 0,039$), NK ($p < 0,001$) et HK ($p < 0,001$) et dans CA3 (ANOVA $p < 0,001$) pour NK (Fisher : $p < 0,001$) et HK ($p = 0,046$). On n'observe pas en revanche de différence statistiquement significative entre NC, HC et HK : en particulier on ne montre pas de potentialisation de la neuroprotection apportée par le régime cétogène et la restriction calorique.

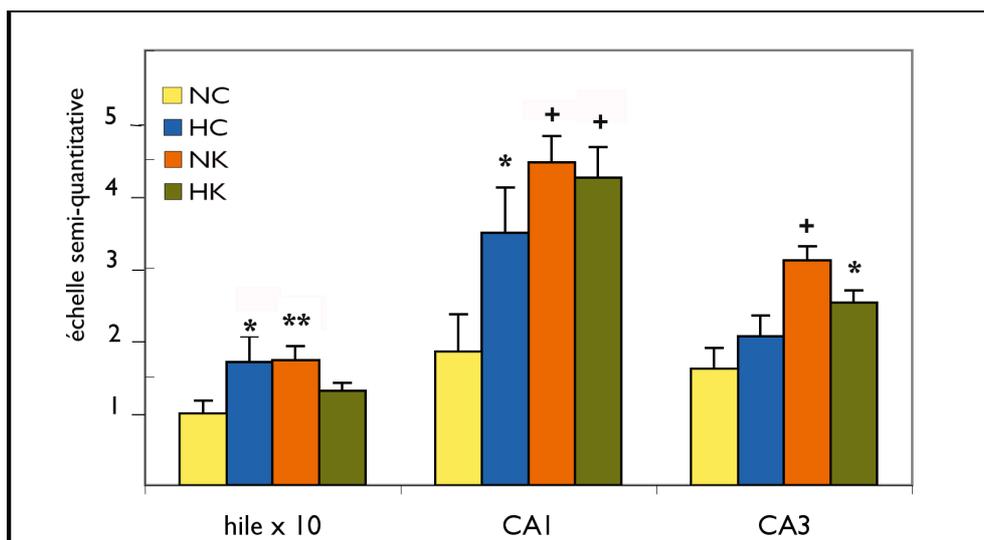


Figure 17 : Neuroprotection de l'hippocampe conférée par le régime cétogène

La neuroprotection conférée à certaines structures hippocampiques par le régime cétogène n'est pas potentialisée par la restriction calorique. ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$; + $p < 0,001$)*

3.3.2. Discussion

3.3.2.1. *Caractéristique cliniques et électroencéphalographiques du modèle lithium pilocarpine en fonction du régime*

Les caractéristiques de l'état mal induit par le lithium pilocarpine ne sont pas influencées par un régime cétogène et/ou hypocalorique. Elles sont similaires sur le plan clinique et électroencéphalographique à celles rapportées dans le modèle (Clifford, et al. 1987a,b, Cavalheiro 1995, Priel, et al. 1996). Le protocole expérimental utilisé n'avait pas pour but d'observer une différence de sensibilité à la pilocarpine, ce qui aurait nécessité des injections de doses progressivement croissantes (Hirsch, et al. 1992). La similarité de l'état de mal entre les groupes de rat permet d'analyser les conséquences en terme d'épileptogénèse et de neuroprotection éventuelle.

On observe une mortalité élevée, proche de 50%, à la suite de l'état de mal chez les animaux soumis à une restriction calorique: bien que la tolérance de la restriction calorique soit apparemment satisfaisante, ces animaux, lorsqu'il sont soumis à une situation extrême de stress et de dépense calorique comme l'état de mal ont moins de capacités physiques pour le surmonter. Cette différence n'est pas due au poids inférieur des animaux en restriction calorique: comme nous l'avons déjà montré dans notre étude sur les crises épileptiques induites par le pentylènetétrazole, les animaux au régime cétogène normocalorique ont un poids significativement plus faible que les animaux au régime glucidique normocalorique, sans que la mortalité à la suite des crises toniques souvent létales soit différente dans ces deux groupes (Raffo, et al. 2007).

La durée de la phase de latence, en moyenne de 20 jours, n'est pas influencée par le régime des animaux au moment de l'état de mal. Cette observation est en accord avec les caractéristiques de base du modèle dans lequel quasiment tous les animaux adultes deviennent secondairement épileptiques lorsqu'ils sont nourris par un régime glucidique standard (Leite, et al. 1990, Cavalheiro 1995, Andre, et al. 2000a,b). Sur les critères cliniques habituellement utilisés, on n'observe donc pas de modification de l'épileptogénèse induite par le régime cétogène et/ou la restriction calorique.

A la phase chronique, les animaux présentent initialement des crises limbiques, puis des crises motrices généralisées, de plus en plus longues. L'allongement et la sévérité croissante des crises a déjà été rapportée dans le modèle Lithium-Pilocarpine. Ce phénomène n'est pas non plus influencé par le régime des animaux au moment de l'état de mal (Leite, et al. 1990, Cavalheiro 1995).

3.3.2.2. *Neuroprotection induite par le régime cétogène et/ou hypocalorique dans le modèle Lithium-Pilocarpine*

Malgré l'absence d'effets visibles en terme d'épileptogénèse, l'influence des différents régimes est nette sur la plan des dommages neuronaux, mais elle ne concerne que les structures hippocampiques. Au niveau des cortex entorhinal et piriforme les dommages cellulaires sont similaires entre les groupes d'animaux avec une quasi destruction des couches II et III.

Par rapport aux animaux nourris au régime glucidique normocalorique, les animaux nourris au régime cétogène normocalorique ont une densité de neurones proche du double dans CA1, CA3 et le hile du gyrus denté. Le même effet est observé avec un régime glucidique hypocalorique, hormis dans CA3. Cependant, on doit remarquer que l'effet du régime cétogène et de la restriction calorique ne s'additionnent pas: la neuroprotection n'est non seulement pas supérieure dans le groupe HK, mais elle ne peut plus être statistiquement mise en évidence par rapport au groupe NC dans une structure comme le hile. Pour expliquer cette possible diminution de la neuroprotection dans le groupe HK, on doit prendre en compte qu'en dehors d'un effet anti-inflammatoire et anti-oxydant, l'effet neuroprotecteur du régime cétogène déjà montré dans certaines maladies neurologiques dégénératives est probablement lié à la capacité conférée aux neurones de faire face à des demandes métaboliques extrêmes (Maalouf, et al. 2007, Gasior, et al. 2006). Par ailleurs, on sait que les dommages neuronaux observés dans le modèle Lithium-Pilocarpine siègent dans les régions de forte augmentation métabolique au moment de l'état de mal (Turski, et al. 1983, Turski, et al. 1989, Cavalheiro 1995, Dube, 2000b, Dube, 2001a, Santiago, et al. 2006). Or, dans notre expérimentation, les animaux du groupe HK ont un stock de glycogène réduit et, comme l'indique leur faible poids, une masse de tissus adipeux de réserve réduite également. Nous formulons l'hypothèse que lors de l'état de mal, les animaux du groupe HK pourraient ne pas disposer de suffisamment de glucose ou d'acides gras mobilisables pour faire face à l'augmentation de la demande énergétique de manière aussi efficace ou aussi prolongée que ceux des autres groupes.

La neuroprotection conféré par le régime cétogène ou la restriction calorique dans le modèle Lithium-Pilocarpine est comparable, en ce qui concerne les dommages neuronaux dans l'hippocampe, à celle obtenue avec différentes substances pharmacologiques comme le vigabatrin et le topiramate, ainsi que par le kindling amygdalien (Andre, et al. 2000b, Andre, et al. 2001, Rigoulot, et al. 2004).

Lors de l'état de mal lithium-pilocarpine, les besoins métaboliques dans l'hippocampe et les cortex para-hippocampiques sont considérablement augmentés. Or le potentiel oxydatif du glucose peut difficilement couvrir l'ensemble des besoins énergétiques générées par les crises épileptiques sévères et prolongées, d'où les dommages neuronaux subséquents. Le régime cétoène, en augmentant les autres substrats énergétiques disponibles, pourrait conférer une neuroprotection dans ces régions à haut niveau métabolique lors de la phase précoce de l'état de mal.

Comme cela a déjà été observé avec d'autres stratégies de neuroprotection, ni le régime cétoène ni la restriction calorique ne permettent par la seule protection de l'hippocampe de retarder ni d'empêcher l'épileptogénèse. Par contre, la seule protection des cortex para-hippocampiques permet de retarder la survenue des premières crises spontanées (Andre, et al. 2003). Un travail récent de l'équipe a montré que la protection conjointe de l'hippocampe et des cortex para-hippocampiques obtenue avec une molécule en développement, le RWJ333369, permet d'empêcher l'apparition de crises motrices spontanées (François, et al. 2005). Il n'est donc pas surprenant que le régime cétoène qui confère une neuroprotection dans les régions hippocampes seulement mais ne prévient la dégénérescence rapide qui se produit au sein des cortex para-hippocampiques n'ait aucune influence sur l'épileptogénèse.

3.3.3. Conclusion

Ni la restriction calorique ni le régime cétogène ne modifient les caractéristiques de l'état de mal induit par le Lithium-Pilocarpine chez l'animal adulte. Les conséquences de cet état de mal en terme d'épileptogénèse ne sont pas non plus influencées par les régimes des animaux au moment de la phase aiguë: la période de latence est courte, en moyenne de 20 jours, et quasiment tous les animaux présentent ensuite spontanément des crises limbiques secondairement généralisées .

Nous avons pu montrer un effet neuroprotecteur de la restriction calorique et/ou du régime cétogène hypocalorique sur les structures hippocampiques habituellement lésées dans ce modèle d'épilepsie limbique. On ne montre en revanche pas de potentialisation de l'effet neuroprotecteur du régime cétogène par la restriction calorique. Les cortex parahippocampiques sont très lésés quel que soit le régime auquel sont soumis les animaux ce qui explique l'absence de retentissement sur l'épileptogénèse.

3.4. Publication n°3 : Propriétés anti-épileptiques du régime cétogène dans le modèle de crises induites par pentylènetétrazole

3.4.1. Résultats

3.4.1.1. Tolérance et efficacité des régimes

Ce travail a été mené sur 40 rats. Malgré la très bonne tolérance des régimes, au moment de la détermination des seuils, les rats soumis à un régime cétogène, étaient significativement plus légers que ceux soumis à un régime glucidique, d'autant plus si une restriction calorique était associée (Figure 18).

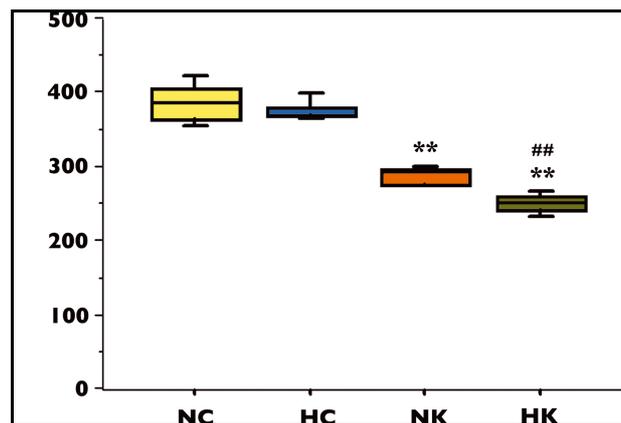


Figure 18 : Poids des animaux après trois semaines de régime

*Après 21 jours de régime imposé, les animaux NK et HK ont un poids significativement plus faible que les animaux NC et HC (** $p < 0,01$); La différence de poids est également significative entre les groupe NK et HK (## $p < 0,01$).*

Sur le plan métabolique, la restriction calorique seule ne permet pas d'augmenter significativement le taux de β -hydroxybutyrate et la glycémie reste inchangée. Le régime cétogène employé permet a contrario une augmentation de β -hydroxybutyrate, et une glycémie plus basse, ce qui est encore majoré par une restriction calorique associée (Figure 19).

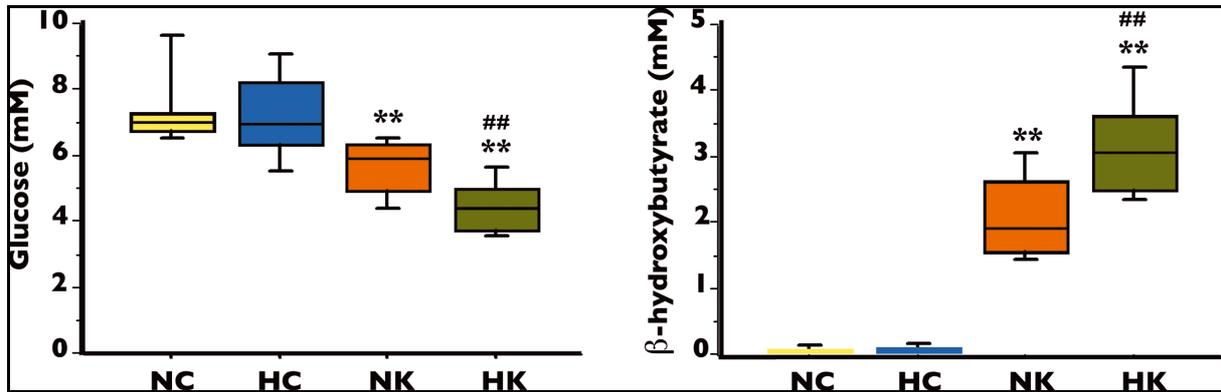


Figure 19 : Glycémie et taux de β -hydroxybutyrate sanguin après trois semaines de régime

Les dosages sanguins de glucose et β -hydroxybutyrate sont significativement plus faibles chez les animaux NK et HK par rapport aux animaux NC et HC (** $p < 0,01$); Cette différence est également statistiquement significative entre les groupe HK et NK (### $p < 0,01$).

3.4.1.2. Seuils électrocliniques des crises induites par pentylènetétrazole

La symptomatologie électroclinique stéréotypée des crises induites par le PTZ ne diffère pas selon le régime employé. On observe sur le plan clinique d'abord une perte du comportement d'exploration, puis des épisodes isolés d'arrêt complet de l'activité motrice. Secondairement l'animal semble figé mais parcouru de myoclonies erratiques. Surviennent ensuite des myoclonies massives de l'axe. Enfin on observe une crise clonique soutenue au niveau des membres. L'interruption de la perfusion après le début de la crise clonique n'empêche pas l'évolution vers une crise tonique chez certains animaux, avec une même proportion quel que soit le groupe étudié (NC=3/9; HC=2/10; NK=3/10; HK=4/9). Les manifestations EEG sont rapportées sur la Figure 20.

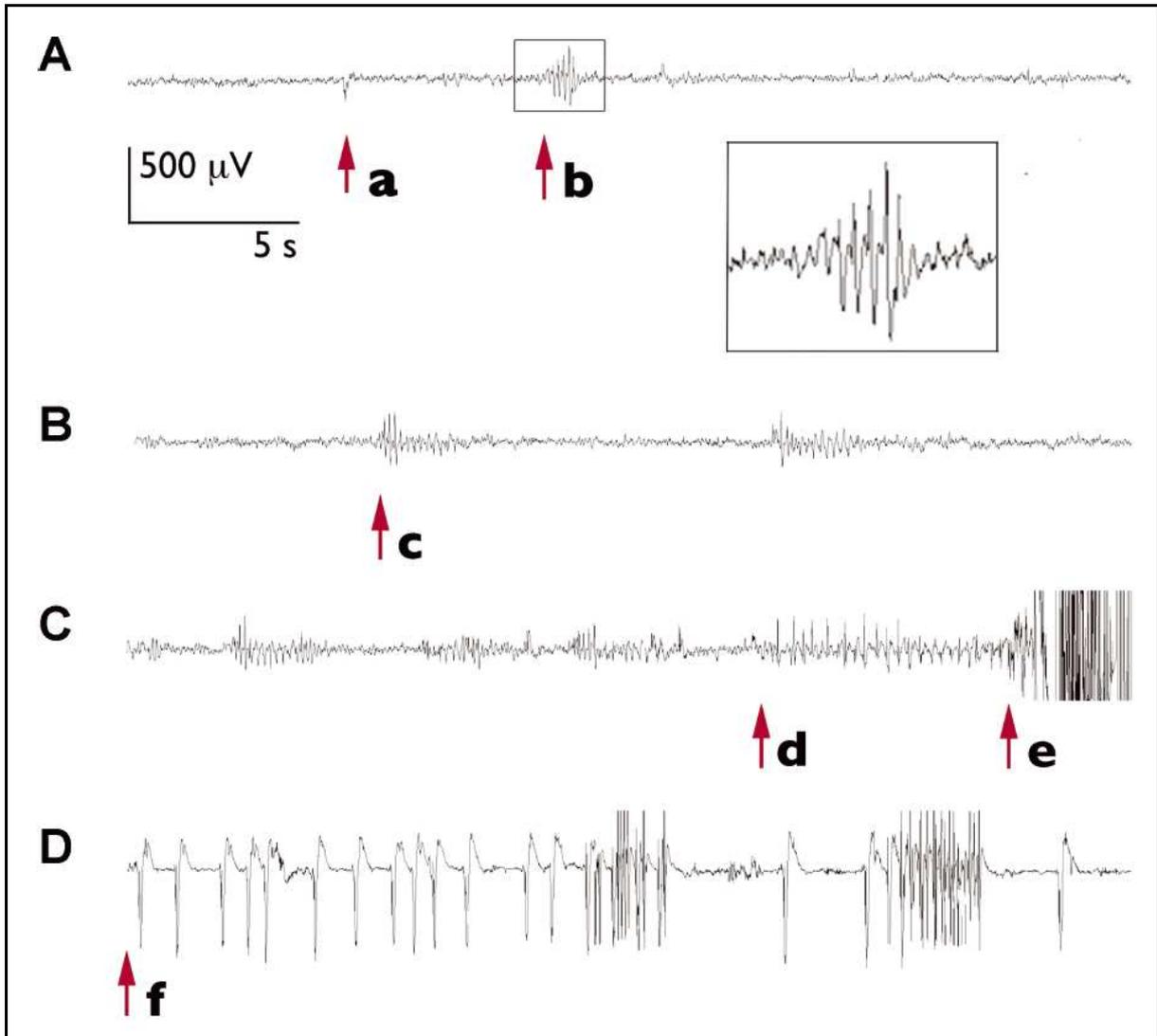


Figure 20 : Caractéristiques EEG des crises induites par pentylènetétrazole intraveineux

Evolution caractéristique des patterns EEG induits par la perfusion IV continue de PTZ.
 A: stades précoces: pointes isolées (a) et première bouffée de pointe-ondes (b).
 B: bouffées récurrentes de pointe-ondes (c) sur un tracé de fond normal
 C: Pointe-ondes subcontinues (d) puis pointes recrutantes de grande amplitude (e)
 D: Très ample pointe-ondes lentes sur une activité de fond déprimée

Si le déroulement des crises induites par pentylènetétrazole intra-veineux n'est pas influencé par le régime, en revanche, l'analyse statistique des seuils exprimés en dose/poids pour chaque type de manifestation permet de montrer des différences significatives entre les groupes d'animaux (ANOVA multivariée: $p=0,035$).

Ainsi, sur le plan EEG, le seuil pour la première pointe est significativement plus bas dans le groupe NC par rapport aux groupes HC, NK et HK ($p=0.036$). Pour tous les autres critères électroencéphalographiques, le seuil pour le groupe HK est plus élevé que pour les trois autres groupes d'animaux (Figure 21).

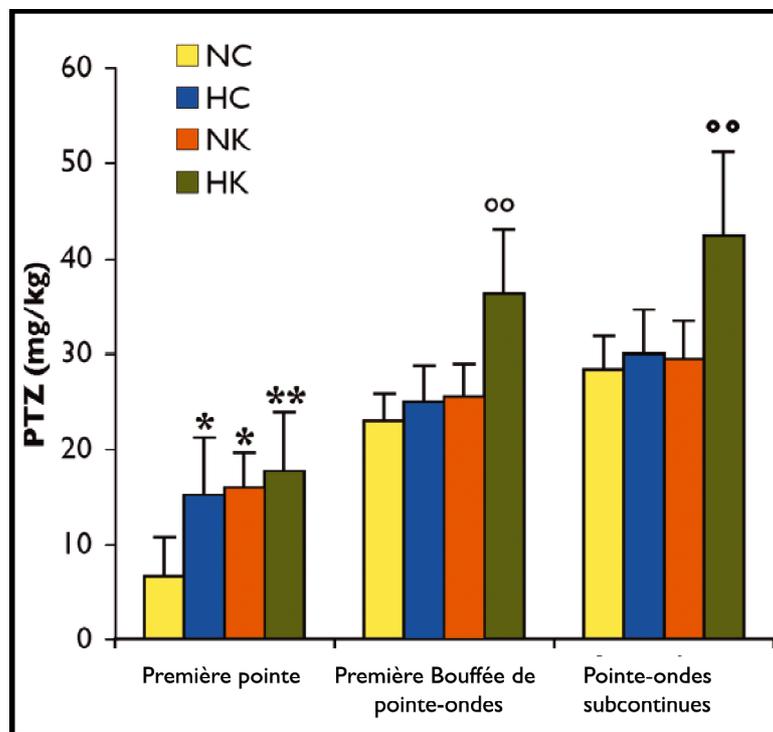


Figure 21 : Seuils électroencéphalographiques des crises induites par pentylènetétrazole

*On montre par rapport au groupe NC une augmentation du seuil pour la première pointe dans groupe HC, NK, HK ($*p<0,05$; $**p<0,01$). Pour la première bouffée de pointe-ondes comme pour le début de l'activité de pointe-ondes sub-continues, l'augmentation de seuil est significative entre le groupe HK et chacun des trois autres groupes ($^{\circ\circ}p<0,01$).*

Sur le plan clinique, la diminution de sensibilité au PTZ est significative pour la première absence ($p=0,003$), la première myoclonie ($p=0,028$) et le début de la crise clonique ($p=0,006$) (Figure 22). Sur la plan EEG, on montre de même une diminution significative de sensibilité au PTZ pour l'induction de la première décharge de pointe-ondes (qui précède parfois la première absence reconnue cliniquement)($p=0,014$), et l'aspect de pointe-ondes sub-continues ($p=0,005$) (Figure 21). L'analyse de régression statistique n'a montré aucune corrélation entre ces différents seuils et le taux de glucose ou de β -hydroxybutyrate circulant.

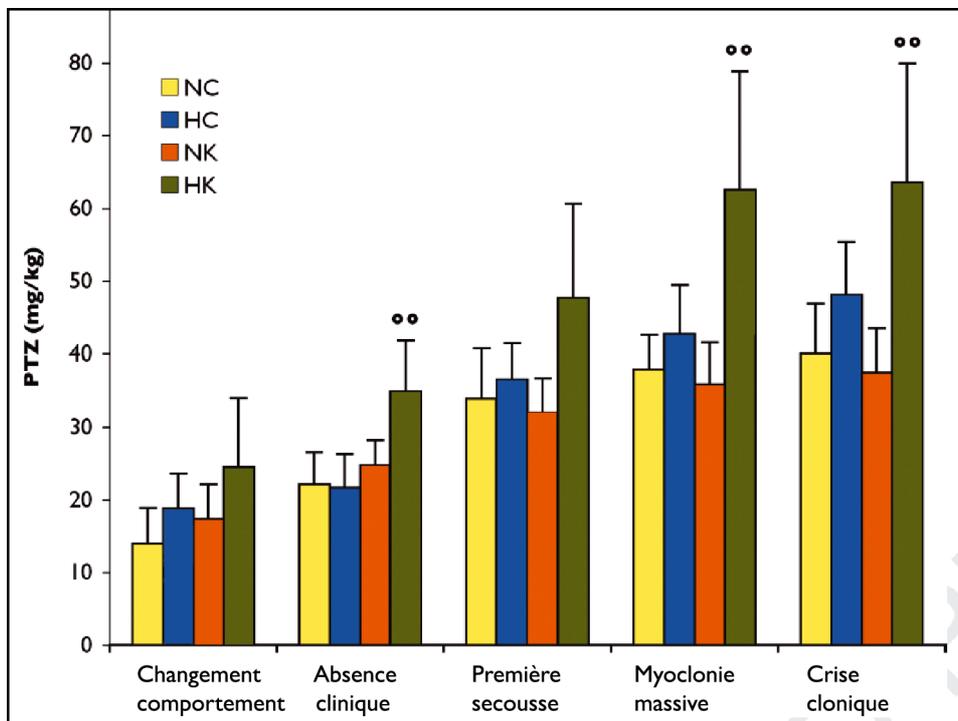


Figure 22 : Seuils cliniques des crises induites par pentylènetétrazole

Les seuils observés pour la première absence, la première myoclonie massive et la crise clonique sont statistiquement plus élevés pour le groupe HK que pour chacun des trois autres groupes ($^{\circ}p<0,01$).

3.4.2. Discussion

3.4.2.1. Poids des animaux – influence sur les seuils

Les rats nourris au régime cétogène ont une croissance pondérale moindre. Il a déjà été montré que la seule augmentation du taux de composés cétoniques au niveau cérébral, à apport calorique équivalent, peut être responsable de cette différence. Ce moindre accroissement pondéral, d'autant plus important que le ratio du régime cétogène est élevé, s'explique par le biais d'une augmentation de la dépense énergétique de base et de la production de chaleur (Davis, et al. 1981, Sakaguchi, et al. 1988, Bough, et al. 2000b, Bough et Eagles 2001, Bough, et al. 2006). Avec la restriction calorique que nous avons utilisée, les rats gardent un accroissement pondéral ; seul une restriction de plus de 40% induirait un arrêt de croissance (Klurfeld, et al. 1989).

Nous avons comparé les seuils exprimés en dose de PTZ par rapport à la masse de l'animal, comme c'est proposé dans la littérature (Bough, et al. 1999b). Cependant une controverse existe : pour certains auteurs, puisque les animaux au régime cétogène ont un poids plus faible, l'expression de la dose de PTZ en fonction de ce poids serait responsable d'une augmentation artificielle des seuils pour ces animaux, alors que la plupart des auteurs considèrent cet effet comme accessoire (Auvin, et al. 2006, Bough et Eagles 1999, Bough, et al. 1999b, Nysten, et al. 2005). Nous avons donc répété notre analyse statistique pour chaque seuil en considérant la latence d'induction des crises qui ne tient pas compte du poids. Nous montrons toujours une protection vis à vis de la survenue de la crise clonique chez les animaux au régime cétogène hypocalorique (Figure 23).

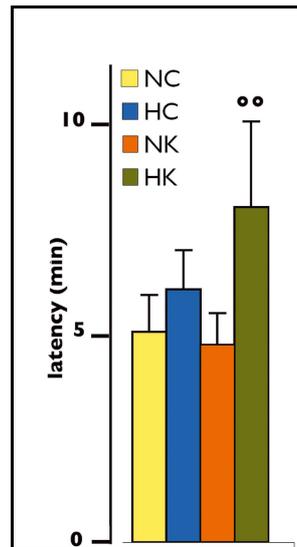


Figure 23 : Latence de la crise clonique après injection de pentylènetétrazole intraveineux

La latence de la crise ne tient pas compte du poids des animaux. L'allongement de latence de la crise clonique est significative pour les animaux du groupe HK par rapport à chacun des autres groupes ($^{\circ}P < 0,01$).

3.4.2.2. Patterns de crises induites par PTZ - effets du régime

Le déroulement des crises induites par PTZ n'est pas influencée par le type de régime ce qui a déjà été rapporté (Bough, et al. 1999b). Notre étude est la première publiée qui tiennent compte à la fois de toutes les caractéristiques cliniques et EEG pour déterminer l'efficacité d'une stratégie de protection vis à vis des crises induites par PTZ. Il nous paraît en particulier important de considérer les premières anomalies paroxystiques induites, dont le seuil est modifié à la fois par le type de régime et l'apport calorique. Nous avons pu également montrer qu'au delà de la première absence électroclinique, pour laquelle une augmentation du seuil par le régime cétogène hypocalorique est démontré, on peut isoler un état d'absence, pour des doses de PTZ plus élevées. Cet état de mal non convulsif est caractérisé par une activité de pointe-ondes subcontinues sur l'EEG alors que l'animal n'a plus de comportement exploratoire, mais parfois de fines myoclonies. Le seuil pour ce pattern électroclinique est également augmenté chez les animaux soumis à un régime cétogène hypocalorique.

Dans le modèle au PTZ, les seuils les plus communément déterminés sont cliniques : première myoclonie massive et crise tonique (Loscher et Fiedler 1996). Cependant les autres patterns électrocliniques sont stéréotypés et permettent la détermination de seuils.

Bough et collaborateurs ont déjà montré que le seuil de la première myoclonie massive induite par PTZ est plus élevé chez des rats nourris plus de 20 jours avec un régime cétogène 6,3/1 restreint de 10% en calorie, par rapport à un régime glucidique d'apport calorique équivalent. Cette différence existe quelque soit l'âge auquel le régime est débuté entre P22 et l'âge adulte. Par ailleurs, cette protection est d'autant plus efficace que le régime a été introduit précocement avant P50 et qu'il est associé à une restriction calorique (Bough, et al. 1999b). Nous avons pu montrer cette protection pour la plupart des patterns électrocliniques identifiables dans ce modèle avec un régime 4/1 restreint de 15% en calorie.

L'absence de corrélation entre les seuils déterminés et le taux de glucose et de β -hydroxybutyrate sanguin est retrouvés par les précédents auteurs (Bough, et al. 1999a, Bough, et al. 2000b). Nous montrons qu'aucun pattern de crises, quelque soit sa sévérité, n'est corrélé à ces taux sanguins. L'efficacité du régime cétogène comme anti-convulsivant dépend d'autres mécanismes que de la cétose en elle-même, parmi lesquels l'optimisation du métabolisme cellulaire (Bough et Rho 2007). De la même façon un régime glucidique hypocalorique peut avoir un effet anti-convulsivant alors qu'il n'induit pas d'augmentation des composés cétoniques circulants (Bough, et al. 1999b). Dans notre étude, cet effet n'a pas pu être montré, mais il nécessite, d'après les données de la littérature, une restriction calorique de 35%, beaucoup plus importante que celle que nous avons employée (Eagles, et al. 2003).

3.4.2.3. *Sévérité des crises – absence d'effet du régime*

Deux modèles ont été particulièrement utilisés pour déterminer l'effet anti-convulsivant du régime cétogène chez le rat : le seuil pour la première myoclonie induite par PTZ et l'estimation de la sévérité des crises par le calcul du ratio extension/flexion après stimulation par électrochoc maximal (MES). Dans ce modèle, les animaux nourris au régime cétogène ont un seuil convulsivant plus élevé, mais sans modification de l'intensité de la (Hori, et al. 1997) ce qui semble indiquer une différence dans la capacité du régime cétogène à retarder ou empêcher les crises et sa capacité à en réduire la sévérité (Mahoney, et al. 1983, Otani, et al. 1984, Bough, et al. 2000a, Thavendiranathan, et al. 2000, Bough, et al. 2003). Cependant les différences observées pourraient être secondaires aux modes différents d'induction des crises dans les modèles PTZ et MES. Notre protocole expérimental permet dans un même modèle la comparaison de seuils pour plusieurs patterns qui correspondent à différents stades de crises. Même si une nette élévation des seuils dans le groupe cétogène hypocalorique est démontrée, tous les rats ont *in fine* des crises de la même sévérité. De plus, le même

pourcentage de rats atteindra une crise tonique dans chaque groupe, alors que l'injection de PTZ à déjà été stoppée au début de la crise clonique. Nous confirmons donc dans un même modèle expérimental l'efficacité sur le seuil convulsivant du régime cétogène hypocalorique, alors qu'il n'induit pas de protection contre la sévérité de la crise en elle-même.

Conclusion

Cette étude montre la bonne tolérance du régime cétogène employé qui permet d'obtenir une cétose significative chez le rat.

Nous avons précisé les patterns électrocliniques successifs des crises induites par perfusion continue de pentylènetétrazole intraveineux. Nous avons en particulier distingué les absences isolées survenant sur un tracé EEG de fond organisé, de l'état de mal absence myoclonique induit par des doses plus élevées. Le déroulement des crises ne diffère pas selon le régime utilisé.

Nous montrons l'efficacité anti-convulsivante d'un régime cétogène hypocalorique : il augmente le seuil pour la plupart des patterns de crises induites dans le modèle PTZ. En revanche le régime cétogène ne modifie pas la sévérité des crises une fois qu'elles ont commencé.

Conclusions générales – Perspectives

L'arsenal thérapeutique actuellement disponible pour la prise en charge des patients épileptiques est insuffisant. Malgré le nombre de molécules anti-épileptiques développées dans les 20 dernières années, le pourcentage d'épilepsies pharmacorésistantes a peu diminué. Par ailleurs aucune drogue actuellement disponible sur le marché n'a de réel potentiel anti-épileptogène, c'est-à-dire de capacité à enrayer le mécanisme d'épileptogénèse. Le développement de thérapeutiques alternatives doit s'appuyer sur une meilleure connaissance de la physiopathologie des crises et des remaniements qui sous-tendent la récurrence de crises spontanées.

Notre réflexion est partie de la constatation de la moindre vulnérabilité des animaux immatures à l'état de mal induit par le Lithium-Pilocarpine. Pendant le premier mois de vie post-natale chez le rat la latence d'apparition d'une épilepsie secondaire à l'état de mal est nettement allongée par rapport aux rats adultes. Certains animaux, et en particulier les plus immatures ne deviennent pas épileptiques après l'état de mal. Sur le plan physiologique, les différences entre ces animaux immatures et adultes tiennent autant à la constitution, la stabilisation et la myélinisation des réseaux neuronaux qu'à la maturation des voies du métabolisme énergétique. Or le métabolisme des substrats énergétiques est étroitement liée à celui du couple de neurotransmetteurs formé par le glutamate et le GABA.

Afin d'appréhender les fondements métaboliques de la moindre vulnérabilité à l'état de mal induit par le Lithium-Pilocarpine chez les animaux immatures, nous avons donc précisé la cinétique de maturation de deux enzymes clés du métabolisme énergétique du glucose: la lactate déshydrogénase pour la glycolyse anaérobie, et la cytochrome oxydase comme voie finale commune du métabolisme aérobie. Dans les structures impliquées précocement dans l'état de mal, hippocampe et cortex parahippocampiques on observe entre P10 et P21 une augmentation de la capacité oxydative et une diminution de l'activité potentielle de la LDH qui ont déjà atteint des niveaux comparables à ceux des animaux adultes. Parmi les structures du cerveau antérieur, seule l'amygdale et en particulier l'amygdale médiale n'atteint un maximum d'activité CO que plus tardivement, à l'âge adulte. Pour les structures impliquées dans le circuit de contrôle des crises, de la même façon, les formations rhombencéphaliques et mésencéphaliques ont atteint un potentiel oxydasique mature dès P21, alors qu'il augmente encore pour le noyau caudé jusqu'à P35.

Après avoir précisé le profil physiologique de maturation des activités de la CO et de la LDH, nous avons déterminé les modifications induites par un état de mal épileptique induit par le Lithium-Pilocarpine en fonction de l'âge de cette agression. A la phase aiguë, 4 heures et 24 heures après le début de l'état de mal, lorsqu'une différence est observée, il s'agit toujours d'une diminution du potentiel de la CO. Ainsi, les animaux adultes qui ont un métabolisme énergétique oxydatif prédominant souffrent également de la diminution d'activité oxydasique la plus sévère et la plus étendue. Cette diminution d'activité CO concerne toutes les structures secondairement lésées. En revanche, les rats P21 qui ont dans presque toutes les structures cérébrales une activité CO similaire à celle des adultes, n'ont pas de diminution d'activité CO après l'état de mal en dehors de CA3. On n'observe en particulier pas de modification dans le cortex entorhinal et ces animaux ne deviennent pas tous épileptiques. Les rats P10 sont nourris par le lait maternel, très riche en lipides, et les composés cétoniques constituent le principal substrat énergétique de leur métabolisme énergétique cérébral; l'activité CO est physiologiquement basse dans les structures impliquées dans l'état de mal, et aucune modification n'est visible à la phase aiguë. Cette absence de modification d'activité CO pourrait être liée à l'immaturation de l'ensemble de la voie oxydative chez le rat à P10 et indiquer que la demande métabolique accrue liée à l'état de mal est couverte par la voie anaérobie à cet âge. Cependant, seule la mesure d'activité de la LDH à cet âge pourrait permettre de confirmer cette hypothèse.

A la phase chronique, lorsque les animaux présentent des crises spontanées, les activités métaboliques LDH et CO sont diminuées dans les structures très lésées comme le cortex entorhinal. Cependant, la plupart des structures qui sont le siège de dommages neuronaux gardent une capacité métabolique régionale identique en particulier pour la LDH, ce qui peut être lié à la gliose réactionnelle. L'activité CO augmentée dans les structures du circuit de contrôle des crises témoigne de l'activation de ce circuit dès le début de la phase chronique.

Une deuxième partie de notre travail a consisté à étudier la vulnérabilité d'animaux adultes alimentés avec un régime cétogène afin de les placer dans des conditions métaboliques proches de celles des animaux immatures en ce qui concerne les substrats métaboliques. Ce régime a été associé ou non à une restriction calorique qui entraîne par elle-même une diminution de la glycémie. Nous avons montré que les caractéristiques électrocliniques de l'état de mal induit par le Lithium-Pilocarpine ne sont pas modifiées par les différents régimes. Ceci autorise la comparaison des caractéristiques cliniques et histologiques de l'épilepsie secondaire à cet état de mal. Nous avons ainsi montré que le régime cétogène

comme la restriction calorique constituent des stratégies efficaces mais limitées de neuroprotection. Cette neuroprotection n'est conférée qu'aux structures hippocampiques, elle ne retarde pas et n'empêche pas l'épileptogénèse. Par ailleurs, on n'observe pas de potentialisation de la neuroprotection par la restriction calorique associée au régime cétogène.

A la phase aiguë des crises, aucune modification de l'état de mal induit par le Lithium-Pilocarpine n'a pu être montrée. Nous avons donc utilisé un modèle plus sensible pour évaluer l'efficacité des régimes testés comme anti-convulsivants potentiels. Nous avons ainsi pu montrer, chez l'animal adulte, l'efficacité anti-convulsivante d'un régime cétogène hypocalorique lors de l'injection intra-veineuse de pentylènetétrazole. Bien que ce régime ne modifie pas la sévérité des crises, il augmente dans ce modèle, le seuil de survenue des manifestations paroxystiques épileptiques, que ce soient les décharges électroencéphalographiques infracliniques, les absences comme les crises motrices.

Perspectives

Pour l'évaluation de l'efficacité anti-épileptique d'un traitement, nous avons montré la remarquable sensibilité du modèle de crises induites par le pentylènetétrazole lorsque l'étude des seuils cliniques est associée à celle des seuils électroencéphalographiques. Dans la littérature, l'efficacité comparée des régimes cétogènes à base de triglycérides à chaîne longue, comme celui que nous avons employé, et de régimes riches en triglycérides à chaîne moyenne est débattu. Nous proposons de comparer ces deux traitements diététiques grâce à l'outil que nous avons précisé (Schwartz, et al. 1989b, Thavendiranathan, et al. 2000).

Le régime cétogène est principalement utilisé à l'âge pédiatrique. Par ailleurs, nous savons que les rats P21 sont à une période charnière de vulnérabilité pour l'état de mal induit par le Lithium-Pilocarpine. L'étude des capacités de neuroprotection du régime cétogène que nous avons pu mettre en évidence chez l'animal adulte doit être complétée par une étude similaire à cet âge clef. L'expérimentation nécessitera de séparer les rats dès P15 de leur mère pour éviter l'accès au régime alimentaire glucidique standard qui lui est fourni. Cette étude, basée sur les aspects cliniques et histologiques, pourra être associée à une évaluation dans les structures hippocampiques de l'hypersignal T2 sur l'IRM précoce après l'état de mal: ce marqueur a une forte valeur prédictive positive pour la survenue d'une épilepsie ultérieure (Roch, et al. 2002a).

En clinique humaine, le régime cétogène est employé dans les épilepsies pharmacorésistantes, en association avec des traitements pharmacologiques. Nous avons pu montrer l'efficacité du régime cétogène comme stratégie de neuroprotection dans l'hippocampe chez l'animal après un état de mal induit par le Lithium-Pilocarpine. Cependant, cette protection ne suffit pas à empêcher ni même à retarder la survenue d'une épilepsie secondaire. On sait qu'il est nécessaire dans le modèle Lithium-Pilocarpine de protéger à la fois l'hippocampe et les cortex parahippocampiques pour modifier l'épileptogénèse. Il nous paraît donc particulièrement intéressant de tester l'efficacité anti-épileptogène éventuelle de l'association d'un régime cétogène et d'une drogue comme le prégabaline qui a la capacité de minimiser les dommages neuronaux dans l'hippocampe (Andre, et al. 2003).

Bibliographie

A

Almeida A, Brooks K, Sammut I, Keelan J, Davey G, Clark J, Bates T. (1995) Postnatal development of the complexes of the electron transport chain in synaptic mitochondria from rat brain. *Dev Neurosci* 17:212-218.

Altman D, Perlman J, Volpe J, Powers W. (1993) Cerebral oxygen metabolism in newborns. *J Pediatr* 92:99-104.

Andre V, Ferrandon A, Marescaux C, Nehlig A. (2000a) Electroshocks delay seizures et subsequent epileptogenesis but do not prevent neuronal damage in the Lithium-Pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res* 42:7-22.

Andre V, Ferrandon A, Marescaux C, Nehlig A. (2000b) The lesional and epileptogenic consequences of Lithium-Pilocarpine-induced status epilepticus are affected by previous exposure to isolated seizures: effects of amygdala kindling and maximal electroshocks. *Neuroscience* 99:469-481.

Andre V, Ferrandon A, Marescaux C, Nehlig A. (2001) Vigabatrin protects against hippocampal damage but is not antiepileptogenic in the Lithium-Pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 47:99-117.

Andre V, Pineau N, Motte JE, Marescaux C, Nehlig A. (1998) Mapping of neuronal networks underlying generalized seizures induced by increasing doses of pentylentetrazol in the immature and adult rat: a c-Fos immunohistochemical study. *Eur J Neurosci* 10:2094-2106.

Andre V, Rigoulot MA, Koning E, Ferrandon A, Nehlig A. (2003) Long-term pregabalin treatment protects basal cortices and delays the occurrence of spontaneous seizures in the Lithium-Pilocarpine model in the rat. *Epilepsia* 44:893-903.

Appleton DB, DeVivo DC. (1974) An animal model for the ketogenic diet. *Epilepsia* 15:211-227.

Auvin S, Shin D, Mazarati A, Sankar R. (2006) The utility of testing pentylentetrazol threshold. *Epilepsia* 47:662-663; author reply 663-664.

B

Baud O, Fayol L, Gressens P, Pellerin L, Magistretti P, Evrard P, Verney C. (2003) Perinatal and early postnatal changes in the expression of monocarboxylate transporters MCT1 and MCT2 in the rat forebrain. *J Comp Neurol* 465:445-454.

Bilger A, Nehlig A. (1991) Quantitative histochemical changes in enzymes involved in energy metabolism in the rat brain during postnatal development. I. Cytochrome oxidase and lactate dehydrogenase. *Int J Dev Neurosci* 9:545-553.

- Bilger A, Nehlig A. (1992) Quantitative histochemical changes in enzymes involved in energy metabolism in the rat brain during postnatal development. II. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and beta-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Int J Dev Neurosci* 10:143-152.
- Bittar P, Charnay Y, Kiraly M, Pellerin L, Bouras C, Magistretti P. (1995) Selective distribution of lactate deshydrogenase (LDH) isoenzymes in neurons and astrocytes : evidence for activity-dependent metabolic trafficking. *Soc Neurosci Abstr. Soc Neurosci Abstr* 21:1668.
- Bonavita V, Ponte F, Amore G. (1962) Lactate deshydrogenase isoenzymes in the developing rat brain. *Nature* 196:576-577.
- Bonavita V, Ponte F, Amore G. (1963) Lactate deshydrogenase isoenzymes in the nervous tissue. *J Neurochem* 11:39-47.
- Bonavita V, Ponte F, Amore G. (1964) Lactate Dehydrogenase Isoenzymes in the Nervous Tissue. Iv. An Ontogenetic Study on the Rat Brain. *J Neurochem* 11:39-47.
- Booth R, Patel T, Clark J. (1980) The development of enzymes of energy metabolism in the brain of a precocial (guinea pig) and non précocial (rat) species. *J Neurochem* 34:17-25.
- Borowski I, Collins R. (1989) Metabolic anatomy of brain : A comparison of regional capillary density, glucose metabolism, and enzyme activities. *J Comp Neurol* 288:401-413.
- Bough KJ, Chen RS, Eagles DA. (1999a) Path analysis shows that increasing ketogenic ratio, but not beta-hydroxybutyrate, elevates seizure threshold in the Rat. *Dev Neurosci* 21:400-406.
- Bough KJ, Eagles DA. (1999) A ketogenic diet increases the resistance to pentylentetrazole-induced seizures in the rat. *Epilepsia* 40:138-143.
- Bough KJ, Eagles DA. (2001) Re: Dietary fat, ketosis, and seizure resistance in rats on the ketogenic diet. *Epilepsy Res* 44:213-217.
- Bough KJ, Matthews PJ, Eagles DA. (2000a) A ketogenic diet has different effects upon seizures induced by maximal electroshock and by pentylentetrazole infusion. *Epilepsy Res* 38:105-114.
- Bough KJ, Paquet M, Pare JF, Hassel B, Smith Y, Hall RA, Dingledine R. (2007) Evidence against enhanced glutamate transport in the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet. *Epilepsy Res* 74:232-236.
- Bough KJ, Rho JM. (2007) Anticonvulsant mechanisms of the ketogenic diet. *Epilepsia* 48:43-58.
- Bough KJ, Schwartzkroin PA, Rho JM. (2003) Calorie restriction and ketogenic diet diminish neuronal excitability in rat dentate gyrus in vivo. *Epilepsia* 44:752-760.
- Bough KJ, Valiyil R, Han FT, Eagles DA. (1999b) Seizure resistance is dependent upon age and calorie restriction in rats fed a ketogenic diet. *Epilepsy Res* 35:21-28.
- Bough KJ, Wetherington J, Hassel B, Pare JF, Gawryluk JW, Greene JG, Shaw R, Smith Y, Geiger JD, Dingledine RJ. (2006) Mitochondrial biogenesis in the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet. *Ann Neurol* 60:223-235.
- Bough KJ, Yao SG, Eagles DA. (2000b) Higher ketogenic diet ratios confer protection from seizures without neurotoxicity. *Epilepsy Res* 38:15-25.

Bouzier AK, Thiaudiere E, Biran M, Rouland R, Canioni P, Merle M. (2000) The metabolism of [3-(13)C]lactate in the rat brain is specific of a pyruvate carboxylase-deprived compartment. *J Neurochem* 75:480-486.

Brown AM, Ransom BR. (2007) Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 55:1263-1271.

Bruehl C, Kloiber O, Hossman K, Dorn T, Witte O. (1995) Regional hypometabolism in an acute model of focal epileptic activity in the rat. *Eur J Neurosci* 7:192-197.

C

Casebolt TL, Jope RS. (1987) Chronic lithium treatment reduces norepinephrine-stimulated inositol phospholipid hydrolysis in rat cortex. *Eur J Pharmacol* 140:245-246.

Cavalheiro E. (1995) The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci* 16:33-37.

Cavalheiro E, Silva D, Turski W, Calderazzo-Filho L, Bortolotto Z, Turski L. (1987) The susceptibility of rats to pilocarpine-induced seizures is age-dependent. *Dev Brain Res* 37:43-58.

Cavalheiro EA, Turski L. (1986) Intrastratial N-methyl-D-aspartate prevents amygdala kindled seizures in rats. *Brain Res* 377:173-176.

Chapman AG, Meldrum BS, Siesjo BK. (1977) Cerebral metabolic changes during prolonged epileptic seizures in rats. *J Neurochem* 28:1025-1035.

Clifford D, Olney W, Maniotis A, Collins R, Zorumski C. (1987a) The functional anatomy and pathology of Lithium-Pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience* 23:953-968.

Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF. (1987b) The functional anatomy and pathology of Lithium-Pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience* 23:953-968.

Cruikshank JW, Brudzynski SM, McLachlan RS. (1994) Involvement of M1 muscarinic receptors in the initiation of cholinergically induced epileptic seizures in the rat brain. *Brain Res* 643:125-129.

D

Daikhin Y, Yudkoff M. (2000) Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J Nutr* 130:1026S-1031S.

Dariett D, Der T, Collins R. (1986) Distribution of cytochrome oxidase in rat brain : studies with diaminobenzidine histochemistry in vitro and 14C cyanide tissue labeling in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 6:8-14.

Davis JD, Wirtshafter D, Asin KE, Brief D. (1981) Sustained intracerebroventricular infusion of brain fuels reduces body weight and food intake in rats. *Science* 212:81-83.

Depaulis A, Vergnes M, Marescaux C. (1994) Endogenous control of epilepsy : the nigral inhibitory system. *Progr Neurobiol* 42:33-55.

Deransart C, Vercueil L, Marescaux C, Depaulis A. (1998) The role of basal ganglia in the control of generalized absence seizures. *Epilepsy Res* 32:213-223.

Dierks-Ventling C, Cone AL. (1971) Acetoacetyl--coenzyme A thiolase in brain, liver, and kidney during maturation of the rat. *Science* 172:380-382.

Dobbing J, Sands J. (1979) Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 3:79-83.

Dube C, Boyet S, Marescaux C, Nehlig A. (2000a) Progressive metabolic changes underlying the chronic reorganization of brain circuits during the silent phase of the Lithium-Pilocarpine model of epilepsy in the immature and adult Rat. *Exp Neurol* 162:146-157.

Dube C, Boyet S, Marescaux C, Nehlig A. (2001a) Relationship between neuronal loss and interictal glucose metabolism during the chronic phase of the Lithium-Pilocarpine model of epilepsy in the immature and adult rat. *Exp Neurol* 167:227-241.

Dube C, da Silva Fernandes MJ, Nehlig A. (2001b) Age-dependent consequences of seizures and the development of temporal lobe epilepsy in the rat. *Dev Neurosci* 23:219-223.

Dube C, Marescaux C, Nehlig A. (2000b) A metabolic and neuropathological approach to the understanding of plastic changes that occur in the immature and adult rat brain during Lithium-Pilocarpine-induced epileptogenesis. *Epilepsia* 41 Suppl 6:S36-43.

Duelli R, Kuschinsky W. (2001) Brain glucose transporters: relationship to local energy demand. *News Physiol Sci* 16:71-76.

Duncan J. (1997) Imaging and epilepsy. *Brain* 120:339-377.

E

Eagles DA, Boyd SJ, Kotak A, Allan F. (2003) Calorie restriction of a high-carbohydrate diet elevates the threshold of PTZ-induced seizures to values equal to those seen with a ketogenic diet. *Epilepsy Res* 54:41-52.

el Hamdi G, de Vasconcelos AP, Vert P, Nehlig A. (1992) An experimental model of generalized seizures for the measurement of local cerebral glucose utilization in the immature rat. I. Behavioral characterization and determination of lumped constant. *Brain Res Dev Brain Res* 69:233-242.

F

Fayol L, Baud O, Monier A, Pellerin L, Magistretti P, Evrard P, Verney C. (2004) Immunocytochemical expression of monocarboxylate transporters in the human visual cortex at midgestation. *Brain Res Dev Brain Res* 148:69-76.

Fernandes MJ, Dube C, Boyet S, Marescaux C, Nehlig A. (1999) Correlation between hypermetabolism and neuronal damage during status epilepticus induced by lithium and pilocarpine in immature and adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:195-209.

Ford D. (1973) Selected maturational changes observed in the postnatal rat brain. *Prog Brain Res* 40:1-12.

François J, Ferrandon A, E. K, Nehlig A. (2005) A new drug RWJ 333369 protects limbic areas in the Lithium-Pilocarpine model (li-pilo) of epilepsy and delays or prevents the occurrence of spontaneous seizures. (abstract). *Epilepsia* 46:269-270.

Freeman J, Veggiotti P, Lanzi G, Tagliabue A, Perucca E. (2006) The ketogenic diet: from molecular mechanisms to clinical effects. *Epilepsy Res* 68:145-180.

Freeman JM, Kossoff EH, Hartman AL. (2007) The ketogenic diet: one decade later. *Pediatrics* 119:535-543.

Freeman JM, Vining EP, Pillas DJ, Pyzik PL, Casey JC, Kelly LM. (1998) The efficacy of the ketogenic diet-1998: a prospective evaluation of intervention in 150 children. *Pediatrics* 102:1358-1363.

Freund TF, Ylinen A, Miettinen R, Pitkanen A, Lahtinen H, Baimbridge KG, Riekkinen PJ. (1992) Pattern of neuronal death in the rat hippocampus after status epilepticus. Relationship to calcium binding protein content and ischemic vulnerability. *Brain Res Bull* 28:27-38.

Fujikawa DG, Dwyer BE, Lake RR, Wasterlain CG. (1989) Local cerebral glucose utilization during status epilepticus in newborn primates. *Am J Physiol* 256:C1160-1167.

Fujikawa DG, Vannucci RC, Dwyer BE, Wasterlain CG. (1988) Generalized seizures deplete brain energy reserves in normoxemic newborn monkeys. *Brain Res* 454:51-59.

Furler SM, Jenkins AB, Storlien LH, Kraegen EW. (1991) In vivo location of the rate-limiting step of hexose uptake in muscle and brain tissue of rats. *Am J Physiol* 261:E337-347.

G

Garant DS, Gale K. (1987) Substantia nigra-mediated anticonvulsant actions: role of nigral output pathways. *Exp Neurol* 97:143-159.

Gasior M, Rogawski MA, Hartman AL. (2006) Neuroprotective and disease-modifying effects of the ketogenic diet. *Behav Pharmacol* 17:431-439.

Gerhart DZ, Enerson BE, Zhdankina OY, Leino RL, Drewes LR. (1997) Expression of monocarboxylate transporter MCT1 by brain endothelium and glia in adult and suckling rats. *Am J Physiol* 273:E207-213.

Gerhart DZ, LeVasseur RJ, Broderius MA, Drewes LR. (1989) Glucose transporter localization in brain using light and electron immunocytochemistry. *J Neurosci Res* 22:464-472.

Gonzales RA, Crews FT. (1984) Characterization of the cholinergic stimulation of phosphoinositide hydrolysis in rat brain slices. *J Neurosci* 4:3120-3127.

Gonzales-Lima F, Garrosa M. (1989) Quantitative histochemistry of cytochrome oxidase in rat brain. *Neurosci Lett* 123:251-253.

Greene AE, Todorova MT, McGowan R, Seyfried TN. (2001) Caloric restriction inhibits seizure susceptibility in epileptic EL mice by reducing blood glucose. *Epilepsia* 42:1371-1378.

Greene AE, Todorova MT, Seyfried TN. (2003) Perspectives on the metabolic management of epilepsy through dietary reduction of glucose and elevation of ketone bodies. *J Neurochem* 86:529-537.

H

- Hajek M, Antonini A, Leenders K, Wieser H. (1993) Mesial versus lateral temporal lobe epilepsy : metabolic differences in the temporal lobe shown by interictal 18F-FDG positron emission tomography. *Neurology* 43:79-86.
- Handforth A, Treiman DM. (1995) Functional mapping of the early stages of status epilepticus: a 14C-2-deoxyglucose study in the Lithium-Pilocarpine model in rat. *Neuroscience* 64:1057-1073.
- Hartman AL, Gasiot M, Vining EP, Rogawski MA. (2007) The neuropharmacology of the ketogenic diet. *Pediatr Neurol* 36:281-292.
- Hartman AL, Vining EP. (2007) Clinical aspects of the ketogenic diet. *Epilepsia* 48:31-42.
- Hassel B, Brathe A. (2000) Cerebral metabolism of lactate in vivo: evidence for neuronal pyruvate carboxylation. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:327-336.
- Hawkins RA, Mans AM, Davis DW, Hibbard LS, Lu DM. (1983) Glucose availability to individual cerebral structures is correlated to glucose metabolism. *J Neurochem* 40:1013-1018.
- Hawkins RA, Williamson DH, Krebs HA. (1971) Ketone-body utilization by adult and suckling rat brain in vivo. *Biochem J* 122:13-18.
- Hirsch E, Baram T, Snead O. (1992) Ontogenic study of Lithium-Pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Brain Res* 583:120-126.
- Hirvonen MR, Savolainen K. (1991) Lithium-induced decrease of brain inositol and increase of brain inositol-1-phosphate is transient. *Neurochem Res* 16:905-911.
- Hori A, Tandon P, Holmes GL, Stafstrom CE. (1997) Ketogenic diet: effects on expression of kindled seizures and behavior in adult rats. *Epilepsia* 38:750-758.
- Horton J, Hubel D. (1981) Regular patchy distribution of cytochrome oxidase staining in primary visual cortex of macaque monkey. *Nature* 292:762-764.
- Hovda D, Chugani H, Villablanca J, Badie B, Sutton R. (1992) Maturation of cerebral oxidative metabolism in the cat : a cytochrome oxidase histochemistry study. *J Cereb Blood Flow Metab* 12 12:1039-1048.
- Hovda D, Villablanca J. (1998) Cerebral metabolism following neonatal or adult hemineodecortication in cats : effects on oxidative capacity using cytochrome oxidase histochemistry. *Dev Brain Res* 110:39-50.
- Howse DC. (1983) Cerebral energy metabolism during experimental status epilepticus. *Adv Neurol* 34:209-216.
- Hruska RE, Ludmer LM, Pert A, Bunney WE, Jr. (1984) Effects of lithium on [3H](-)-quinuclidinyl benzilate [(3H](-)-QNB) binding to rat brain muscarinic cholinergic receptors. *J Neurosci Res* 11:171-177.
- Huang YZ, McNamara JO. (2006) Inhibiting glycolysis to reduce seizures: how it might work. *Nat Neurosci* 9:1351-1352.

J

Jacobsen N. (1969) The histochemical localisation of lactic dehydrogenase isoenzymes in the rat nephron by means of an improved polyvinyl alcohol method. *Histochemie* 20:250-265.

Jope RS, Williams MB. (1994) Lithium and brain signal transduction systems. *Biochem Pharmacol* 47:429-441.

K

Klee CB, Sokoloff L. (1967) Changes in D(-)-beta-hydroxybutyric dehydrogenase activity during brain maturation in the rat. *J Biol Chem* 242:3880-3883.

Klein B, Kuschinsky W, Schrock H, Vetterlein F. (1986) Interdependency of local capillary density, blood flow, and metabolism in rat brains. *Am J Physiol* 251:H1333-1340.

Klurfeld DM, Welch CB, Davis MJ, Kritchevsky D. (1989) Determination of degree of energy restriction necessary to reduce DMBA-induced mammary tumorigenesis in rats during the promotion phase. *J. Nutr.* 119:286-291.

Kossoff EH. (2004) More fat and fewer seizures: dietary therapies for epilepsy. *Lancet Neurol* 3:415-420.

Kossoff EH, Pyzik PL, McGrogan JR, Rubenstein JE. (2004) The impact of early versus late anticonvulsant reduction after ketogenic diet initiation. *Epilepsy Behav* 5:499-502.

L

Leite JP, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. (1990) Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev* 14:511-517.

Lemberg MR. (1969) Cytochrome oxidase. *Physiol Rev* 49:48-121.

Leong S, Clark J. (1984) Regional enzyme development in rat brain. Enzymes associated with glucose utilization. *Biochem J* 218:131-138.

Loscher W, Czuczwar SJ, Jackel R, Schwarz M. (1987) Effect of microinjections of gamma-vinyl GABA or isoniazid into substantia nigra on the development of amygdala kindling in rats. *Exp Neurol* 95:622-638.

Loscher W, Fiedler M. (1996) The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. VI. Seasonal influences on maximal electroshock and pentylenetetrazol seizure thresholds. *Epilepsy Res* 25:3-10.

M

Maalouf M, Sullivan PG, Davis L, Kim DY, Rho JM. (2007) Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience* 145:256-264.

Mady MA, Kossoff EH, McGregor AL, Wheless JW, Pyzik PL, Freeman JM. (2003) The ketogenic diet: adolescents can do it, too. *Epilepsia* 44:847-851.

Magistretti PJ, Pellerin L. (1996) Cellular bases of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging: evidence for a prominent role of astrocytes. *Cereb Cortex* 6:50-61.

Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, Shulman RG. (1999) Energy on demand. *Science* 283:496-497.

Mahoney AW, Hendricks DG, Bernhard N, Sisson DV. (1983) Fasting and ketogenic diet effects on audiogenic seizures susceptibility of magnesium deficient rats. *Pharmacol Biochem Behav* 18:683-687.

Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD. (1977) Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* 195:1356-1358.

Maurer MH, Canis M, Kuschinsky W, Duelli R. (2004) Correlation between local monocarboxylate transporter 1 (MCT1) and glucose transporter 1 (GLUT1) densities in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 355:105-108.

McEwen BS, Reagan LP. (2004) Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol* 490:13-24.

Miller JW, Gray BC, Turner GM. (1993) Role of the fastigial nucleus in generalized seizures as demonstrated by GABA agonist microinjections. *Epilepsia* 34:973-978.

Mirski MA, Ferrendelli JA. (1984) Interruption of the mammillothalamic tract prevents seizures in guinea pigs. *Science* 226:72-74.

Morrison JM, Jr., Pritchard HD, Braude MC, D'Aguanno W. (1971) Plasma and brain lithium levels after lithium carbonate and lithium chloride administration by different routes in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 137:889-892.

Motte J, Fernandes M, Baram T, Nehlig A. (1998) Spatial and temporal evolution of neuronal activation, stress and injury in Lithium-Pilocarpine seizures in adult rats. *Brain Res* 793 : 61-72. 793:61-72.

Muller-Schwarze AB, Tandon P, Liu Z, Yang Y, Holmes GL, Stafstrom CE. (1999) Ketogenic diet reduces spontaneous seizures and mossy fiber sprouting in the kainic acid model. *Neuroreport* 10:1517-1522.

N

Nehlig A. (1999) Age-dependent pathways of brain energy metabolism: the suckling rat, a natural model of the ketogenic diet. *Epilepsy Res* 37:211-221.

Nehlig A. (2004) Brain uptake and metabolism of ketone bodies in animal models. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70:265-275.

Nehlig A, Coles JA. (2007) Cellular pathways of energy metabolism in the brain: is glucose used by neurons or astrocytes? *Glia* 55:1238-1250.

Nehlig A, de Vasconcelos AP, Boyet S. (1988) Quantitative autoradiographic measurement of local cerebral glucose utilization in freely moving rats during postnatal development. *J Neurosci* 8:2321-2333.

Nehlig A, Lehr PR. (1982) Activity of acetoacetyl--CoA thiolase and regulation of ketone body metabolism in the brain of the developing chick. *Brain Res* 241:291-297.

Nehlig A, Pereira de Vasconcelos A. (1993) Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Prog Neurobiol* 40:163-221.

Nehlig A, Pereira de Vasconcelos A. (1996) The model of pentylenetetrazol-induced status epilepticus in the immature rat: short- and long-term effects. *Epilepsy Res* 26:93-103.

Nehlig A, Porrino LJ, Crane AM, Sokoloff L. (1985) Local cerebral glucose utilization in normal female rats: variations during the estrous cycle and comparison with males. *J Cereb Blood Flow Metab* 5:393-400.

Nehlig A, Rudolf G, Leroy C, Rigoulot MA, Simpson IA, Vannucci SJ. (2006) Pentylenetetrazol-induced status epilepticus up-regulates the expression of glucose transporter mRNAs but not proteins in the immature rat brain. *Brain Res* 1082:32-42.

Nevander G, Ingvar M, Auer R, Siesjo BK. (1985) Status epilepticus in well-oxygenated rats causes neuronal necrosis. *Ann Neurol* 18:281-290.

Newton M, Berkovic S, Austin M, Rowe C, McKay W, Bladin P. (1992) Postictal switch in blood distribution and temporal lobe seizures. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55:891-894.

Nobrega J, Petrasek J, Raymond R, Dixon L, Burnham W. (1993) Brain cytochrome oxidase activity after kindled seizures : a quantitative histochemical mapping study. *Brain Res* 622:113-118.

Nylen K, Likhodii S, Abdelmalik PA, Clarke J, Burnham WM. (2005) A comparison of the ability of a 4:1 ketogenic diet and a 6.3:1 ketogenic diet to elevate seizure thresholds in adult and young rats. *Epilepsia* 46:1198-1204.

O

Obenaus A, Esclapez M, Houser CR. (1993) Loss of glutamate decarboxylase mRNA-containing neurons in the rat dentate gyrus following pilocarpine-induced seizures. *J Neurosci* 13:4470-4485.

Otani K, Yamatodani A, Wada H, Mimaki T, Yabuuchi H. (1984) [Effect of ketogenic diet on the convulsive threshold and brain amino acid and monoamine levels in young mice]. *No To Hattatsu* 16:196-204.

P

Patel AJ, Balazs R. (1970) Manifestation of metabolic compartmentation during the maturation of the rat brain. *J Neurochem* 17:955-971.

Patel AJ, Johnson AL, Balazs R. (1974) Metabolic compartmentation of glutamate associated with the formation of gamma-aminobutyrate. *J Neurochem* 23:1271-1279.

Patel S, Meldrum B, Fine A. (1988) Susceptibility to pilocarpine-induced seizures in rats increases with age. *Behav Brain Res* 31:165-167.

Paxinos G, Watson C. (1982) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press., New York.

Paz C, Gutierrez-Baeza F, Bazan-Perkins B. (1991) Transection of the superior cerebellar peduncle interferes with the onset and duration of generalized seizures induced by amygdaloid kindling. *Brain Res* 558:90-92.

Pellerin L, Bergersen LH, Halestrap AP, Pierre K. (2005) Cellular and subcellular distribution of monocarboxylate transporters in cultured brain cells and in the adult brain. *J Neurosci Res* 79:55-64.

Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M, Costalat R, Magistretti PJ. (2007) Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 55:1251-1262.

Pellerin L, Magistretti PJ. (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10625-10629.

Pellerin L, Pellegrini G, Bittar PG, Charnay Y, Bouras C, Martin JL, Stella N, Magistretti PJ. (1998a) Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Dev Neurosci* 20:291-299.

Pellerin L, Pellegrini G, Martin JL, Magistretti PJ. (1998b) Expression of monocarboxylate transporter mRNAs in mouse brain: support for a distinct role of lactate as an energy substrate for the neonatal vs. adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3990-3995.

Pereira de Vasconcelos A, el Hamdi G, Vert P, Nehlig A. (1992) An experimental model of generalized seizures for the measurement of local cerebral glucose utilization in the immature rat. II. Mapping of brain metabolism using the quantitative [¹⁴C]2-deoxyglucose technique. *Brain Res Dev Brain Res* 69:243-259.

Persinger M, Bradley KM. (1988) Characteristics of limbic seizures evoked by peripheral injections of lithium and pilocarpine. *Physiol Behav* 44:27-37.

Pineau N, Charriaut-Marlangue C, Motte J, Nehlig A. (1999) Pentylentetrazol seizures induce cell suffering but not death in the immature rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 112:139-144.

Priel M, Santos NFd, Cavalheiro E. (1996) Developmental aspects of the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res* 26:115-121.

Pritchett DB, Sontheimer H, Shivers BD, Ymer S, Kettenmann H, Schofield PR, Seeburg PH. (1989) Importance of a novel GABAA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature* 338:582-585.

R

Raffo E, François J, Ferrandon A, Koning E, Nehlig A. (2007) Calorie-restricted ketogenic diet increases thresholds to all patterns of pentylentetrazole-induced seizures: critical importance of electroclinical assessment. *Epilepsia* in press.

Rho JM, Kim DW, Robbins CA, Anderson GD, Schwartzkroin PA. (1999) Age-dependent differences in flurothyl seizure sensitivity in mice treated with a ketogenic diet. *Epilepsy Res* 37:233-240.

Rigoulot MA, Koning E, Ferrandon A, Nehlig A. (2004) Neuroprotective properties of topiramate in the Lithium-Pilocarpine model of epilepsy. *J Pharmacol Exp Ther* 308:787-795.

Robinson PJ, Rapoport SI. (1986) Glucose transport and metabolism in the brain. *Am J Physiol* 250:R127-136.

Roch C, Leroy C, Nehlig A, Namer IJ. (2002a) Magnetic resonance imaging in the study of the Lithium-Pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in adult rats. *Epilepsia* 43:325-335.

Roch C, Leroy C, Nehlig A, Namer IJ. (2002b) Predictive value of cortical injury for the development of temporal lobe epilepsy in 21-day-old rats: an MRI approach using the Lithium-Pilocarpine model. *Epilepsia* 43:1129-1136.

Rogers AE. (1979) Nutrition. In Baker HJ, Lindsey, J.R., Weisbroth, S.H. , (Ed) *The Laboratory Rat*. Academic Press, Orlando.

Romijn HJ, Hofman MA, Gramsbergen A. (1991) At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? *Early Hum Dev* 26:61-67.

Ryvlin P. (1997) Physiopathologie des anomalies du métabolisme cérébral du glucose dans l'épilepsie du lobe temporal. Lyon I, p. 245.

S

Sakaguchi T, Arase K, Bray GA. (1988) Effect of intrahypothalamic hydroxybutyrate on sympathetic firing. *Metabolism* 37:732-735.

Sankar R, Shin DH, Liu H, Mazarati A, Pereira de Vasconcelos A, Wasterlain CG. (1998) Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences. *J Neurosci* 18:8382-8393.

Santiago JF, Carvalho FF, Perosa SR, Siliano MR, Cruz JW, Fernandes MJ, Cavalheiro EA, Amado D, da Graca Naffah-Mazzacoratti M. (2006) Effect of glycemic state in rats submitted to status epilepticus during development. *Arq Neuropsiquiatr* 64:233-239.

Schwartz RH, Eaton J, Bower BD, Aynsley-Green A. (1989a) Ketogenic diets in the treatment of epilepsy: short-term clinical effects. *Dev Med Child Neurol* 31:145-151.

Schwartz RM, Boyes S, Aynsley-Green A. (1989b) Metabolic effects of three ketogenic diets in the treatment of severe epilepsy. *Dev Med Child Neurol* 31:152-160.

Shank RP, Bennett GS, Freytag SO, Campbell GL. (1985) Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools. *Brain Res* 329:364-367.

Sherwood N, Timiras P. (1970) *A stereotaxic atlas of the developing rat brain*. University of California Press, Berkeley.

Sirven J, Whedon B, Caplan D, Liporace J, Glosser D, O'Dwyer J, Sperling MR. (1999) The ketogenic diet for intractable epilepsy in adults: preliminary results. *Epilepsia* 40:1721-1726.

Sloviter RS. (1991) Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the "dormant basket cell" hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 1:41-66.

Sokoloff L. (1981) Relationships among local functional activity, energy metabolism, and blood flow in the central nervous system. *Fed Proc* 40:2311-2316.

Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Rosiers Md, Patlak C, Pettigrew K, Sakurada O, Shinohara M. (1977) The (¹⁴C)deoxyglucose method for the measurement of local cerebral

glucose utilization : theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem* 28:897-916.

Squires RF, Saederup E, Crawley JN, Skolnick P, Paul SM. (1984) Convulsant potencies of tetrazoles are highly correlated with actions on GABA/benzodiazepine/picrotoxin receptor complexes in brain. *Life Sci* 35:1439-1444.

Swink TD, Vining EP, Freeman JM. (1997) The ketogenic diet: 1997. *Adv Pediatr* 44:297-329.

T

Takagaki G. (1974) Developmental changes in glycolysis in rat cerebral cortex. *J Neurochem* 23:479-487.

Thavendiranathan P, Mendonca A, Dell C, Likhodii SS, Musa K, Iracleous C, Cunnane SC, Burnham WM. (2000) The MCT ketogenic diet: effects on animal seizure models. *Exp Neurol* 161:696-703.

Tholey G, Roth-Schechter BF, Mandel P. (1981) Activity and isoenzyme pattern of lactate dehydrogenase in neurons and astroblasts cultured from brains of chick embryos. *J Neurochem* 36:77-81.

Tsacopoulos M, Magistretti P. (1996) Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* 16:877-885.

Turski L, Ikonomidou C, Turski W, Bortolotto Z, Cavalheiro E. (1989) Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine : a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse* 3:154-171.

Turski W, Cavalheiro E, Schwarz M, Czuczwar S, Kleinrok Z, Turski L. (1983) Limbic seizures produced by pilocarpine in rats : Behavioral, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 9: 315-335.

U

Uhlemann ER, Neims AH. (1972) Anticonvulsant properties of the ketogenic diet in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 180:231-238.

V

Vannucci SJ. (1994) Developmental expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in rat brain. *J Neurochem* 62:240-246.

Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA. (1997) Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 21:2-21.

Vannucci SJ, Simpson IA. (2003) Developmental switch in brain nutrient transporter expression in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E1127-1134.

Vining EP, Freeman JM, Ballaban-Gil K, Camfield CS, Camfield PR, Holmes GL, Shinnar S, Shuman R, Trevathan E, Wheless JW. (1998) A multicenter study of the efficacy of the ketogenic diet. *Arch Neurol* 55:1433-1437.

W

White HS. (2003) Preclinical development of antiepileptic drugs: past, present, and future directions. *Epilepsia* 44 Suppl 7:2-8.

Whitworth P, Heal DJ, Kendall DA. (1989) Chronic lithium treatment enhances inositol polyphosphate formation in mouse brain in vivo. *Br J Pharmacol* 98 Suppl:834P.

Wong-Riley M. (1989) Cytochrome oxidase : an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci* 12:94-101.

Y

Yu AC, Drejer J, Hertz L, Schousboe A. (1983) Pyruvate carboxylase activity in primary cultures of astrocytes and neurons. *J Neurochem* 41:1484-1487.

Z

Zubal I, Spencer S, Imaam K, Seibyl J, Smith E, Wisniewski G, Hoffer P. (1995) Difference images calculated from ictal and interictal technetium-99m-HMPAO SPECT scans of epilepsy. *J Nucl Med* 36:684-689.

Publication 1

Postnatal maturation of cytochrome oxidase and lactate dehydrogenase activity and age-dependent consequences of Lithium-Pilocarpine status epilepticus in the rat: a regional histoenzymology study.

Emmanuel Raffo, Estelle Koning and Astrid Nehlig
INSERM U398, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France

Pediatric Research, 2003. 56(4): 647-55

:

Postnatal maturation of cytochrome oxidase and lactate dehydrogenase activity and age-dependent consequences of lithium-pilocarpine status epilepticus in the rat: a regional histoenzymology study.

RAFFO, Emmanuel, KONING, Estelle, NEHLIG, Astrid

Pediatric Research, 2004, Vol. 56, Numéro 4, Pages 647-655

(C) International Pediatrics Research Foundation, Inc. 2004. All Rights Reserved.

Publication 1: p. 81-89 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1203/01.PDR.0000139604.47609.8C>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Publication 2

Ketogenic diet exhibits neuroprotective effects in the hippocampus but fails to prevent epileptogenesis in the lithium-lilocarpine epilepsy model.

Emmanuel Raffo, Benjamin Linard, Arielle Ferrandon, Estelle Koning and Astrid Nehlig
INSERM U666, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France
Service de Médecine Infantile 1, Hôpital d'Enfants, CHU de Nancy, France

Article en préparation pour *Epilepsia*

Publication 3

Calorie-restricted ketogenic diet increases thresholds to all patterns of pentylenetetrazol-induced seizures: critical importance of electroclinical assessment.

Emmanuel Raffo, Jennifer François, Arielle Ferrandon, Estelle Koning and Astrid Nehlig

INSERM U666, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France

Service de Médecine Infantile 1, Hôpital d'Enfants, CHU de Nancy, France

Epilepsia 2007 – sous presse

**Calorie-restricted ketogenic diet increases thresholds to all patterns of
pentylentetrazol-induced seizures: critical importance of electroclinical
assessment**

Emmanuel RAFFO, Jennifer FRANCOIS, Arielle FERRANDON, Estelle KONING, and Astrid NEHLIG

Epilepsia, 2007, Vol. 49, Numéro 2, Pages 320-328

Publication 3 : p. 92-100 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01380.x>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>