



Étude de stratégies nutritionnelles non-cétogènes dans le traitement de l'épilepsie

Julien Moulard

► To cite this version:

Julien Moulard. Étude de stratégies nutritionnelles non-cétogènes dans le traitement de l'épilepsie . Sciences du Vivant [q-bio]. 2016. hal-01430362

HAL Id: hal-01430362

<https://ephe.hal.science/hal-01430362>

Submitted on 9 Jan 2017

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

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



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

Mémoire présenté par :

MOULARD JULIEN

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Étude de stratégies nutritionnelles non-cétogènes dans le traitement de l'épilepsie

Présenté et soutenu le

devant le jury suivant :

Dr. El HACHIMI Khalid
Dr. ROUACH Nathalie
Dr. CATHELINE Gwenaëlle
Dr. GANGAROSSA Giuseppe
Dr. HUBERFELD Gilles

Président
Tuteur scientifique
Tuteur pédagogique
Rapporteur
Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr. Nathalie Rouach / Dr. Glenn Dallérac

Directeur : *Dr. Nathalie Rouach*

Laboratoire d'accueil : Interactions neurogliales dans la physiopathologie cérébrale
Collège de France
Centre Interdisciplinaire de Recherche en Biologie
11, Place Marcelin Berthelot
75005 Paris

et de :

Dr. Gwenaëlle Catheline

Directeur : *Dr. Joel Swendsen*

Laboratoire EPHE : Neuroimagerie et vie quotidienne
Université Victor Segalen
Bordeaux 2
146 rue Léo Saignat
33076 Bordeaux

Remerciements

Je tiens à remercier Nathalie Rouach et son équipe pour l'accueil, les judicieux conseils et la bonne ambiance. Merci Nathalie pour m'avoir permis de réaliser un travail original au sein de ton laboratoire, la confiance que tu m'as accordée fut un élément essentiel dans la réussite de ce projet d'étude, la science étant un défi de tous les jours, j'adore ça !!!!

Merci à Glenn pour m'avoir guidé tout au long de ce périple, avec patience et compréhension, de *l'In vivo* à *l'In vitro* que d'aventure !

L'ingénieux Pascal, personne indispensable, pilier centrale ou toute la vie d'un laboratoire s'agite, collaboration efficace et heureuse pour ma part !

Jérémie, Jonathan, Ave César, Danijela, l'équipe du bas, Grégory, collègues de tous les jours, échange fructueux et intéressant...

Enfin, à tout le reste des gens que j'ai pu rencontrer au Collège, avec qui j'ai partagé des moments de science ou pas, des laboratoires à l'administration, sans oublier les personnes de l'animalerie. Merci pour ces grands moments d'humanités. Vous comprendrez qu'il y a bien trop de monde à citer et qu'il m'est impossible de tous vous nommer, cela demanderait trop de pages...

À ma famille.....

Table des matières

Liste des figures et tableaux	Error! Bookmark not defined.
Liste des abréviations	2
 1. Introduction	 5
1.1. But de l'étude	5
1.2. Epilepsie et diète cétoène	6
1.3. Métabolisme cérébrale.....	10
1.3.1. <i>Substrats énergétiques et voies métaboliques cérébrales</i>	10
1.3.2. <i>Besoins énergétiques du cerveau</i>	23
1.3.3. <i>Couplage métabolique entre neurone et astrocyte</i>	24
1.3.4. <i>Voies métaboliques utilisant d'autres substrats non glucidiques</i>	29
1.3.4.1. <i>La β-oxydation</i>	29
1.3.4.2. <i>Métabolismes des corps cétoniques</i>	31
1.4. Rationnel de l'étude	35
2. Méthodes	37
2.1. Animaux	37
2.2. Diètes.....	37
2.3. Analyses biochimiques des marqueurs de la cétoène et de la glycolyse ..	37
2.4. Electrophysiologie ex vivo	37
2.5. Enregistrements EEG et vidéo	39
2.6. Modèle murin de convulsions induites par pentylènetétrazole	41
2.7. Modèle kaïnate de l'épilepsie chronique	41
2.8. Western blot.....	42
2.9. Préparation des cerveaux pour marquage au DAPI	42
2.10. Statistiques.....	42
3. Résultats	43
3.1. Elaboration d'une diète combinant différentes stratégies nutritionnelles pour parvenir à un régime à faible ratio [graisses : protéines + glucides]	43
3.2. Effet des régimes alimentaires sur la neurotransmission excitatrice	45

3.3. Test de susceptibilité aux crises induites de manière aiguës.....	48
3.4. Test de protection contre les crises chroniques	50
4. Discussion.....	54
5. Références bibliographiques.....	59
 <i>Annexe 1 : Principe de l'EEG</i>	 75
<i>Annexe 2 : Etiologie et terminologies rencontrées dans l'étude de l'épilepsie</i>	 77
<i>Annexe 3. Anatomie, structure et organisation de l'hippocampe</i>	 83
<i>Annexe 4. Le kaïnate, caractérisation et voies d'actions</i>	 85

Liste des figures

Figure 1. Cinétique d'apparition des médicaments antiépileptiques.....	9
Figure 2. Schéma simplifié de l'organisation générale des différentes voies.....	11
métaboliques retrouvées au niveau de l'organisme	
Figure 3. Métabolisme du glucose et ses trois voies.....	14
Figure 4. Décarboxylation du pyruvate	17
Figure 5. Devenir de l'acétyl-CoA dans le cycle de l'acide tricarboxylique	18
Figure 6. Représentation schématique des constituants de la chaîne respiratoire mitochondriale et de la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative	19
Figure 7. Résumé des principales différences métaboliques rencontrées entre neurones et astrocytes.....	21
Figure 8. Le système de détoxification du méthylglyoxal	22
Figure 9. Effets glycogénolytiques des neurones VIP et des fibres noradrénergiques dans le néocortex	27
Figure 10. Illustration des principales voies énergétiques entre capillaire, astrocyte et neurone	28
Figure 11. Schéma des différentes phases séquentielles permettant l'obtention d'énergie par la mobilisation d'acide gras	30
Figure 12. Voie métabolique des corps cétoniques et leurs régulations.....	34
Figure 13 : émetteur bipolaire implantable permettant l'envoi de données sans fil.....	40
Figure 14 : Système d'acquisition et d'analyse des données pour expérimentation <i>in vivo</i> ...	40
Figure 15. La nouvelle diète combinant différentes stratégies nutritionnelles permet de réduire le rapport [graisse] : [protéines + glucides]	44
Figure 16. Le traitement par la diète combinée réduit la transmission synaptique excitatrice	47
Figure 17. Le traitement par la diète CD diminue la susceptibilité de déclencher des crises.	49
Figure 18. Le traitement CD réduit l'apparition de crises en phase chronique	51
Figure 19. Le traitement CD permet de protéger contre les corrélats moléculaires et histopathologiques exprimés en phase chronique, habituellement retrouvés chez la souris kaïnate	53
Figure 20. Illustration des principes biophysiques de bases dans la mesure des activités cérébrales	76
Figure 21. Synthèse des différentes formes d'épilepsies observable selon de leur origine ...	82
Figure 22. Anatomie structurelle de l'hippocampe	84

Liste des abréviations

AAA ; acide aminé aromatique
ACA ; acétoacétate
ACSF ; liquide céphalorachidien artificiel
AMPA ; acide alpha-amino-3-hydroxy -5-méthyl -4-isoxazolepropionique
ATP ; adénosine triphosphate
ADP ; adénosine diphosphate
BCAA ; acide aminé branché
BDH1 ; β -hydroxybutyrate déshydrogénase
CA1/3 ; corne d'Ammon 1/3
CBF ; flux sanguin cérébral
CD ; diète combinée
CMRGlu ; taux métabolique cérébrale du glucose
CMRO₂ ; taux métabolique cérébrale de l'O₂
CO₂ ; Dioxyde de carbone
CoA/CoASH ; coenzyme A
CPT I/II ; Carnitine Palmitol Transferase I/II
DAPI ; 4',6-diamidino -2-phénylindole
DG ; gyrus denté
DHAP ; dihydroxyacetone phosphate
EEG ; électroencéphalogramme
FAD/FADH₂ ; flavine adénine dinucléotide
fEPSP ; champs de potentiels excitateurs postsynaptiques
FGF21 ; facteur de croissance des fibroblastes
FOXA2 ; forkhead box A2
GABA ; acide γ -aminobutyrique
GA3P ; glycéraldéhyde-3-phosphate
GAPDH ; glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GDP ; guanosine diphosphate
GFAP ; protéine acide fibrillaire gliale
Glo-1/2 ; glyoxalase 1/2
GluR ; récepteurs glutamatergiques

GLUT-1/3 ; transport du glucose 1/3
GPI ; glucose-6-phosphatase isomérase
GSH ; glutathione
GluKR; récepteur kaïnate
GTP; guanosine triphosphate
HK ; hexokinase
HMGCL ; HMG-CoA lyase
HMG-CoA ; 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA
HMGCS2 ; 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA synthase 2
H₂O ; eau
IRMf; imagerie par résonnance magnétique fonctionnelle
KA ; Kaïnate
KD ; diète cétogène
LCFA ; acide gras libre à chaîne longue
LDH ; lactate déshydrogénase
LGI ; index glycémique bas
MAD ; régime Atkins modifié
MCFA ; acide gras libre à chaîne moyenne
MCT; transporteurs d'acides monocarboxyliques
MG ; méthylglyoxal
mTOR ; cible de la rapamycine chez les mammifères
NA ; noradrénaline
NAD⁺/NADH ; nicotinamide adénine dinucléotide
NMDA ; acide N-méthyl-D-aspartique
O₂ ; dioxygène
OEF ; fraction d'O₂
OXCT1 ; succinyl-CoA : 3-oxoacid-CoA transférase
PBS ; tampon phosphate salin
PDH ; pyruvate déshydrogénase
PDK4 ; pyruvate déshydrogénase kinase 4
PFK ; phosphofructokinase
Pfkfb3 ; 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3
PKM1/2 ; pyruvate kinase 1/2
PPARα ; récepteur α nucléaire d'activation et de prolifération des péroxysomes

PTG ; produits terminaux de glycation

PTZ ; pentylènetétrazole

ROS ; espèces réactives de l'oxygène

SIRT3 ; sirtuin 3

SLC16A6 ; membre des transporteurs d'acides monocarboxyliques 6

TA ; transaldolase

TCA; cycle de l'acide tricarboxylique

TEP ; tomographie par émission de positons

TK ; translocase

TLE ; épilepsie du lobe temporal

TPI ; triose phosphate isomérase

VIP ; peptide vasoactif intestinal

β HB ; beta-hydroxybutyrate

1. Introduction

1.1. But de l'étude

L'épilepsie est une maladie neurologique touchant près de 65 millions de personnes dans le monde (Moshé *et al.*, 2014). La découverte d'agents pharmacologiques antiépileptiques durant la seconde moitié du XX^{ème} siècle a fourni un moyen efficace, de contrôle des crises pour une majorité des patients atteints de cette pathologie. Cependant, approximativement un tiers des personnes atteintes présentent une forme d'épilepsie réfractaire, ne répondant pas aux inhibiteurs des canaux sodiques, glutamatergiques ou calciques nécessaires à l'excitation neuronale, ni aux exhausteurs de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), principal neurotransmetteur sous-tendant l'inhibition (Granata *et al.*, 2009 ; Kwan et Brodie, 2000). Dans de tels cas, la solution conventionnelle permettant aux patients de contrôler leurs crises est l'utilisation d'un régime alimentaire spécifique appelé diète cétogène. Cette dernière fut conçue et développée au début des années 1920, pour mimer les changements métaboliques induits par le jeûne, et consiste principalement en une transformation des lipides stockés en corps cétogènes, seules sources d'énergie mobilisables pendant cette période de restriction. Pour atteindre ce but, la diète doit présenter une proportionnalité pondérale de 4 portions de lipides pour 1 portion de glucides + protéines (rapport 4 : 1). Du point de vue calorique, ce régime apporte 90 % de l'énergie nécessaire aux besoins journaliers *via* le gras consommé, de 7 à 8 % par les protéines et 2 à 3 % par les glucides. Malgré l'efficacité incontestable du régime cétogène qui permet de réduire d'au moins 50 % la fréquence des crises, dans approximativement la moitié des patients suivant ce traitement (Miranda *et al.*, 2012 ; Neal *et al.*, 2008), cette solution nutritionnelle est très exigeante et difficile à suivre, de sorte qu'elle n'est pratiquement applicable que chez les jeunes enfants présentant une épilepsie réfractaire (Miranda *et al.*, 2012). Dans ces cas, le régime cétogène est effectivement recommandé, car il est un précieux atout pour éviter les crises durant cette période critique du développement postnatal. Cependant, par sa forte teneur en graisse, cette diète est associée à des risques de complications comprenant essentiellement des néphrolithiases, hyperlipidémie, ainsi que des retards de croissance (Freeman *et al.*, 2007).

Dans la présente étude nous avons recherché à développer une diète saine et palatable possédant des propriétés antiépileptiques, grâce à une approche combinant différentes stratégies nutritionnelles.

1.2. Épilepsie et diète cétogène

En médecine, les modifications du régime alimentaire et leurs bienfaits sur la santé sont connus depuis longtemps, qu'il s'agisse d'un apport ou d'une limitation de substance animale, végétale, minérale, voire même d'une restriction totale de nourriture. Elles furent employées depuis le ^{vème} avant notre ère. En effet, il a été relaté dans le *corpus* Hippocratique, ouvrage réunissant une collection d'une soixantaine de traités de médecine, les propriétés thérapeutiques du jeûne qui étaient alors décrites comme la seule cure possible pour l'épilepsie (Wheless, 2008.). Dans la bible (d'après Matthieu 17 : 14-21), Jésus guérit un enfant épileptique grâce au jeûne et à la prière.

Il fallut attendre le début du XX^{ème} siècle pour voir apparaître les premières études scientifiques sur les vertus thérapeutiques du jeûne contre l'épilepsie. Deux médecins Français, Guelpa et Marie en 1911 montrèrent sur une cohorte composée de vingt enfants et adultes, que la privation de nourriture abaissait la sévérité des crises pendant cette période de restriction, leur travail « la lutte contre l'épilepsie par la désintoxication et par la rééducation alimentaire » fut publié dans la *Revue de thérapie médicochirurgicale*. (Guelpa et Marie, 1911). Une décennie plus tard, c'est un Américain Hugh Conklin, médecin ostéopathe dans le Michigan qui, étant persuadé que l'épilepsie serait due à une intoxication intestinale, préconisa la mise au repos digestif par le biais du jeûne où seule l'eau est admise, et cela pour une période aussi longue que le patient pouvait le supporter. Ce fut un succès (Conklin, 1922), surtout en regard des drogues qui étaient utilisées à ce moment-là, car l'emploi des bromures et du phénobarbital présentaient de nombreux effets secondaires. Devant de tels résultats, un autre Américain, le Dr Rawle Geyelin, endocrinologue au New York Presbyterian Hospital, reprit ce protocole en le limitant à une durée de 20 jours. La cohorte constituée par trente patients âgés de 3,5 à 35 ans répondit très bien à la cure, confirmant ainsi les précédents résultats de Conklin. Il fut le premier à reporter à la convention de l'American Medical Association le

bénéfice de traiter l'épilepsie par le jeûne. (Geyelin, 1921). Toujours dans les années 1920, Drs Cobb et Lennox, deux médecins de l'école de médecine d'Havard, ont montré que le jeûne avait pour effet de diminuer les convulsions dès le 2^{ème} ou 3^{ème} jour de diète. Lennox rapporta également que la baisse du nombre de crises était due à un changement métabolique, et que l'absence de nourriture ou la diminution de glucides consommés conduisait le corps à utiliser des acides gras comme principale source énergétique. (Lennox et Lennox, 1960). C'est grâce aux travaux de Woodyatt sur le diabète en 1921, qu'a pu être mis en évidence l'apparition d'acétone et du β -hydroxybutyrate lors du jeûne ou de diète très faible en glucides et riche en graisses. Ces corps cétoniques sont en effet la résultante immédiate de la métabolisation des acides gras utilisés quand le glucose n'est plus disponible en tant que source énergétique (Woodyatt, 1921).

A la même époque, en vue de traiter les patients atteints d'épilepsie, le Dr Wilder de la Mayo Clinic mit en place un régime alimentaire comportant également une grande proportion de graisse et très peu de glucides, assurant ainsi une cétose plus facile à supporter sur des périodes plus longues que le jeûne. Il nomma ce régime, « ketogenic diet » ou diète cétogène (Wilder, 1921). Toujours à la Mayo Clinic, le Dr Peterman développa par la suite un régime engendrant moins de carences en permettant un apport suffisant de protéines essentielles pour le développement de l'enfant, avec un apport de 1 g de protéine par kilo de poids de corps et par jour, limitant la prise journalière de sucre à 10-15 g, le reste des calories nécessaires au besoin journalier étant fourni par les lipides (Peterman, 1925). De façon remarquable, ce protocole reste proche de ceux en vigueur de nos jours. La diète cétogène fut beaucoup appliquée jusqu'en 1938, date à laquelle la phénytoïne, un bloqueur des canaux sodiques fut découvert par Meritt et Putnam, ce qui eut pour conséquence d'engendrer un désintérêt croissant pour la diète par la communauté scientifique et médicale, se focalisant sur le développement et l'étude de ces nouvelles molécules. Ces approches pharmacologiques persistèrent avec l'apparition de nouvelles drogues telles que l'éthosuximide en 1958, le valproate et la carbamazépine dans les années 60 (Figure 1). De moins en moins de personnes étant correctement formées aux traitements alimentaires, la perte du savoir n'a fait que renforcer l'idée que la diète cétogène est archaïque et donc seulement appliquée, à certains cas rares. Ce sentiment fut reporté dans un texte du Dr Jean

Aicardi qui confiait que beaucoup de praticiens ne trouvaient plus l'utilisation de diète justifiée en regard des thérapies médicamenteuses (Wheless, 1995). Pourtant un article du Dr Livingston du John Hopkins Hospital en 1972 portant sur une étude de plus de mille enfants montra des résultats très encourageants quant aux contrôles des crises par l'utilisation du régime cétogène (Livingston, 1972).

Contre toute attente, la diffusion d'un programme de la NBC en octobre 1994 est venue briser la morosité autour de ce sujet et relancer l'intérêt pour la diète cétogène, en retraçant la lutte de Charlie, un jeune garçon de 2 ans ainsi que de ses parents contre une épilepsie réfractaire à tous traitements. Après avoir consulté de multiples spécialistes, l'état de Charlie restait sans amélioration, chose grave pour un enfant en période critique de développement cérébral. Cependant, l'obstination du père de Charlie finit par aboutir, et c'est au John Hopkins Hospital de Baltimore que fut pris en charge l'enfant par le Dr Freeman et la diététicienne Kelly Millicent, ancienne collaboratrice du Dr Livingston. Traité par la diète cétogène Charlie arriva rapidement à ne plus avoir de crise, à la grande stupeur de son père qui fut étonné qu'un tel traitement ne lui fût jamais proposé auparavant. Il participa donc à la diffusion de ce traitement alors mal connu, à travers une fondation et des vidéos à destination des médecins et nutritionnistes, ainsi que d'autres sources d'informations (Freeman *et al.*, 1994).

Ces dernières années virent la résurrection de ce traitement. Malgré cela, ce type de traitement est souvent choisi en dernière option, car il présente de nombreux effets secondaires et une observance difficile, et demande encore de nombreux efforts pour être mieux perçu auprès des professionnels de santé qui préfèrent l'utilisation moins contraignante des médicaments (Mastriani *et al.*, 2008).

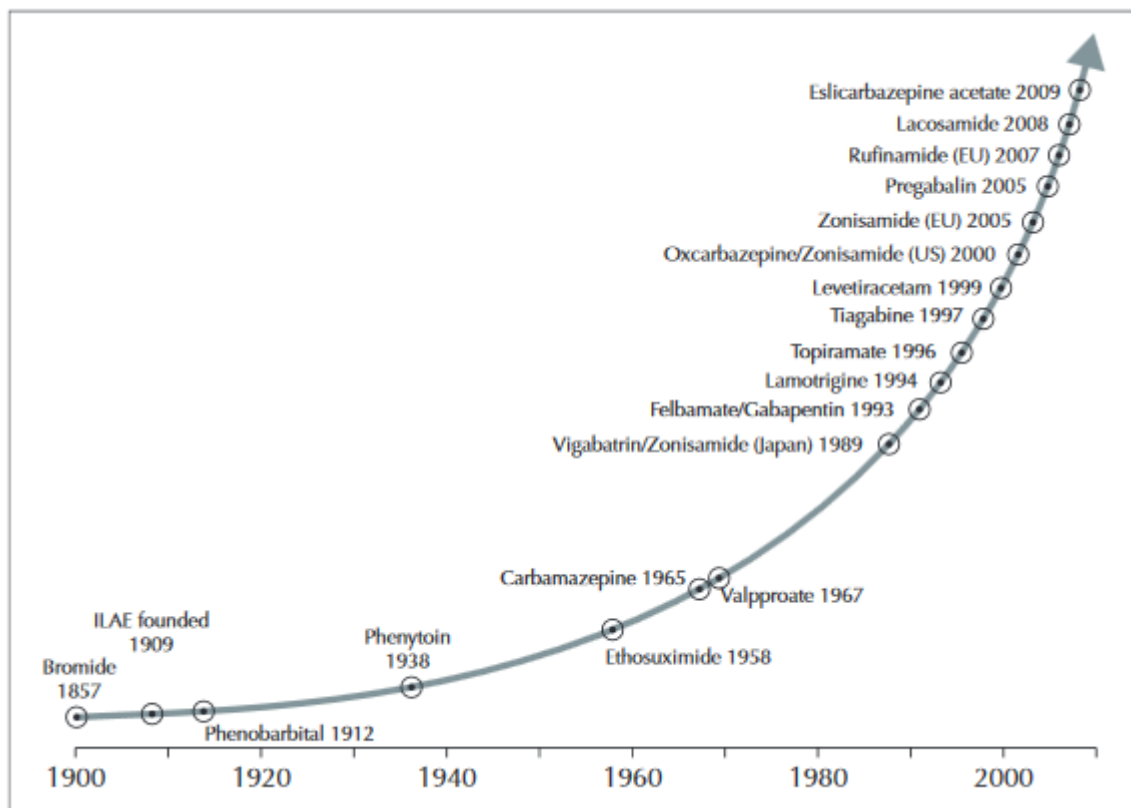


Figure 1. Cinétique d'apparition des médicaments antiépileptiques.

Liste des drogues découvertes contre l'épilepsie au cours du XX siècle, se comporte de manière exponentielle (d'après Arzimanoglou *et al.*, 2010).

1.3. Métabolisme cérébral

1.3.1. Substrats énergétiques et voies métaboliques cérébrales

Le cerveau adulte utilise le glucose comme substrat énergétique préférentiel. Cependant l'existence de voies alternatives et complémentaires permet d'assurer le bon fonctionnement cérébral en cas de déficience glucidique (Figure 2). Le cerveau peut en effet accéder, comme le reste du corps, à différents substrats énergétiques, ce qui lui permet de s'adapter en fonction de ses activités et de la disponibilité nutritionnelle. Les nutriments apportés par la prise alimentaire permettent à la fois une contribution énergétique immédiate, par le glucose, et à moyen/long terme par les acides aminés et lipides pour faire face aux périodes de restriction et/ou de forte activité que peut rencontrer l'organisme. En effet, en fonction de la prise de nourriture plusieurs états métaboliques ont été définis. La période postprandiale correspond aux premières heures suivant le repas, et peut durer jusqu'à 8 heures. Le jeûne quant à lui, se manifeste à partir de 16 heures sans apport alimentaire. La période post-absorptive représente une période d'environ 12 heures de jeûne; généralement ce terme est employé pour désigner l'état de jeûne au levé. Nécessairement, ces différents états métaboliques présentent des variations en regard de la grande variabilité qui existe entre les individus (métaboliseur lent, rapide), leurs activités (actif, sédentaire, sommeil), et leur état de santé général (pathologique ou non). Ces données également peuvent varier pour une même personne au cours du temps de façon imprédictible.

D'un point de vue énergétique les différents macronutriments ne possèdent pas tous les mêmes propriétés. Le pouvoir calorifique des glucides représente un apport de 4 Kcal.g⁻¹. Les lipides fournissent 9 Kcal.g⁻¹ et les protéines 4 Kcal. g⁻¹.

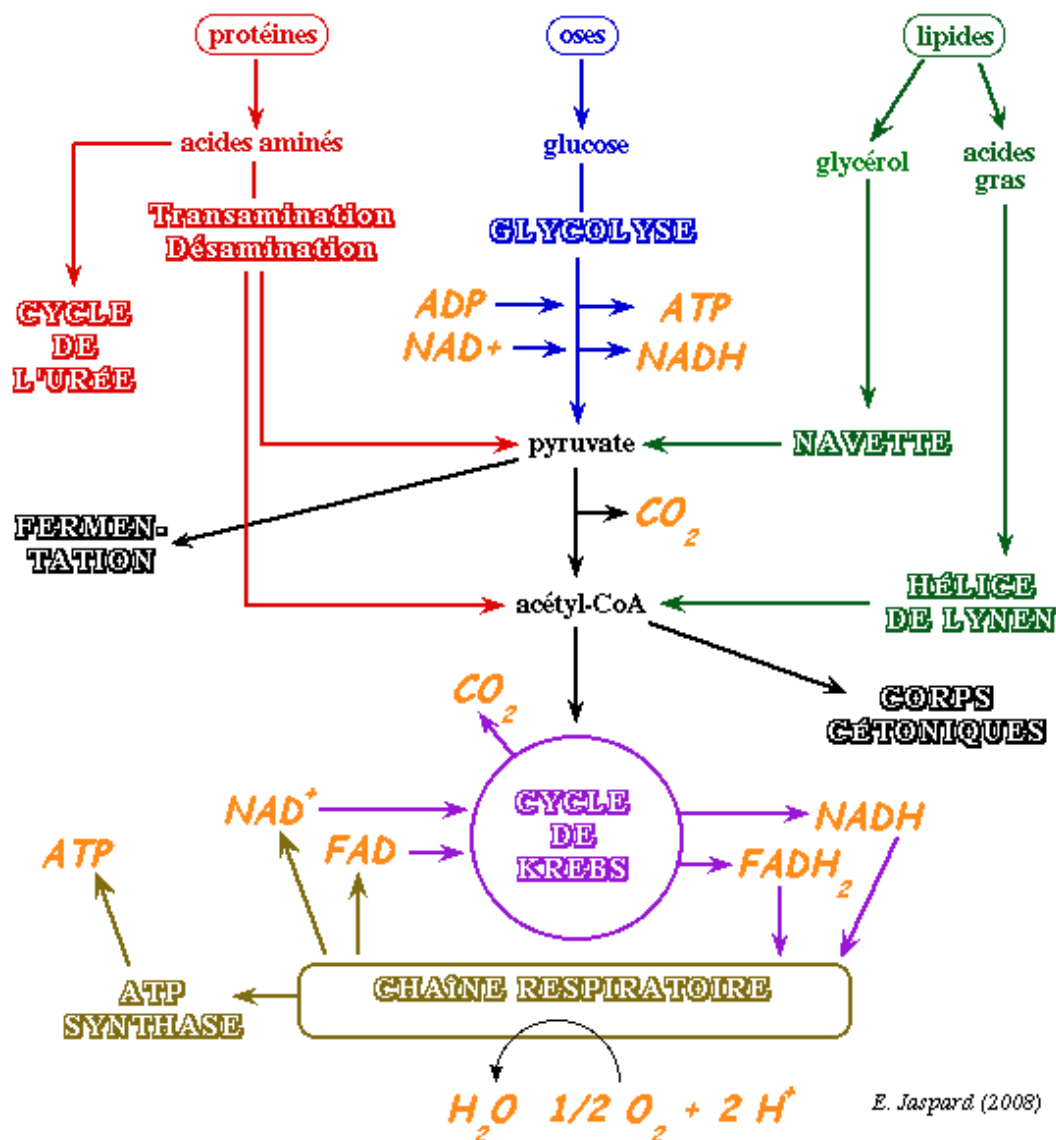


Figure 2. Schéma simplifié de l'organisation générale des différentes voies métaboliques retrouvées au niveau de l'organisme.

La production d'énergie implique des voies biochimiques qui se croisent, impliquant l'existence de véritables carrefours métaboliques aboutissant à la formation d'ATP, d'eau et de CO₂. Le recyclage de co-facteurs, éléments essentiels au bon maintien de ces voies biochimiques peut se retrouver pendant ces étapes.

Les besoins en énergie du cerveau sont considérables. En effet, cet organe qui ne représente que 2 % du poids de corporel total utilise à lui seul ~20 % de l'énergie allouée à l'ensemble du corps chez les êtres humains ($450 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$). Cependant, selon les espèces ces besoins varient, le cerveau des rongeurs peut consommer 2 % des ressources énergétiques ($0.3\text{-}1.2 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$), alors que le primate non-humain va pouvoir mobiliser entre 9 % et 12 % de l'énergie totale ($30\text{-}60 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$) (Mink *et al.*, 1981). Chez l'homme le néocortex, région cérébrale associée aux hautes fonctions cognitives, serait responsable de plus de 40 % de la consommation énergétique cérébrale, ceci afin de répondre aux demandes énergétiques de ces réseaux neuronaux complexes permettant les processus cognitifs supérieurs (Lennie, 2003). Les progrès techniques développés ces dernières années ont permis des études nous renseignant sur les mécanismes cellulaires et moléculaires du métabolisme cérébral. Leurs interactions dynamiques, notamment au niveau du couplage entre astrocytes et neurones, ont permis de mettre en avant l'utilisation complémentaire de différents substrats, et d'apporter une plus grande précision dans la compréhension du rôle de ces derniers dans la physiologie du cerveau.

Il a été montré *in vivo* que le glucose est le substrat énergétique principal du cerveau. Cependant, dans certaines circonstances, d'autres voies métaboliques peuvent prendre le relais et garantir l'approvisionnement énergétique. En particulier, lors du jeûne l'utilisation du produit de dégradation des acides gras, les corps cétoniques, comme substrat énergétique permet notamment d'assurer un fonctionnement cérébral optimal (Pellerin et Magistretti, 2012). Ces différences métaboliques peuvent également se retrouver à l'échelle locale. En effet, l'existence de régulations énergétiques différentielles précises, selon les niveaux d'activité des différentes régions cérébrales sont connues depuis plus d'un siècle. Charles Sherrington (1857 – 1954) avait déjà postulé que le cerveau possède un mécanisme intrinsèque lui permettant de faire varier localement le flux sanguin cérébral en fonction des variations locales de l'activité neuronale. Depuis une décennie, le lactate, un composant longtemps sous-estimé du métabolisme cérébral fit l'objet de nouvelles découvertes. En effet, il a été montré qu'une voie métabolique classique du glucose, la glycolyse aérobie, passe par la formation de lactate (Vaishnavi *et al.*, 2010). Cependant, l'utilisation de cette voie métabolique présente une grande hétérogénéité puisque dans certaines zones cérébrales telles que le cortex préfrontal

elle concerne jusqu'à 25 % du glucose consommé, alors que dans d'autres régions comme le cervelet, elle serait quasiment inutilisée (Bauernfeind *et al.*, 2014 ; Goyal *et al.*, 2014). La glycolyse aérobie est principalement trouvée dans les astrocytes, tandis que les neurones présentent un profil plus oxydatif, avec oxydation totale du glucose, lactate ou pyruvate par le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire de la mitochondrie. Le bilan énergétique de la glycolyse aérobie est la formation de deux molécules d'ATP pour une molécule de glucose. Puis, à partir du pyruvate formé et grâce à l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH), le pyruvate sera catalysé en lactate avec la production en parallèle d'un cofacteur essentiel à la glycolyse, le NAD^+ (Figure 3). Cette réaction catalytique, nommée « effet Warburg », peut se retrouver lorsque l'apport en dioxygène est faible ou en concentration physiologique, et dans certains profils cellulaires (notamment en pathologie, chez les cellules cancéreuses) (Warburg, 1956). Le cycle de Krebs, principale voie métabolique des neurones, permet quant à lui l'oxydation complète du glucose ou de ses métabolites *via* le processus de phosphorylation oxydative (on peut aussi parler de « respiration cellulaire ») dans la matrice mitochondriale et produit de 30 à 36 molécules d'ATP par molécule de glucose, du CO_2 et de l' H_2O (Figure 3) (Bélanger *et al.*, 2011a ; Hyder *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2014 ; Hamberger et Hyden, 1963 ; Hyden et Lange, 1962).

De façon intéressante, l'utilisation d'autres voies métaboliques semble aussi dépendre du type cellulaire. En effet, la catalyse du glucose en glucose-6-P par l'enzyme hexokinase (HK) donne accès à la glycolyse, ainsi qu'à deux autres voies : le stockage du glucose-6-P sous forme de glycogène, voie exclusivement astrocytaire, ou l'entrée du glucose-6-P dans le cycle des pentoses. Cette dernière, fortement utilisée par les neurones, est dédiée à la synthèse de nucléotides par la production de ribose-5-P, mais aussi à la création d'érythrose-4-P un précurseur des acides aminés aromatique, ainsi qu'à la production de NADPH, un cofacteur important pour protéger l'organisme du stress oxydatif par l'intermédiaire du glutathion (GSH) (Figure 3). Une telle différence de voies métaboliques entre astrocytes et neurones est réalisée par un contrôle spécifique des enzymes impliqués dans certaines étapes catalytiques clés pour chaque type cellulaire.

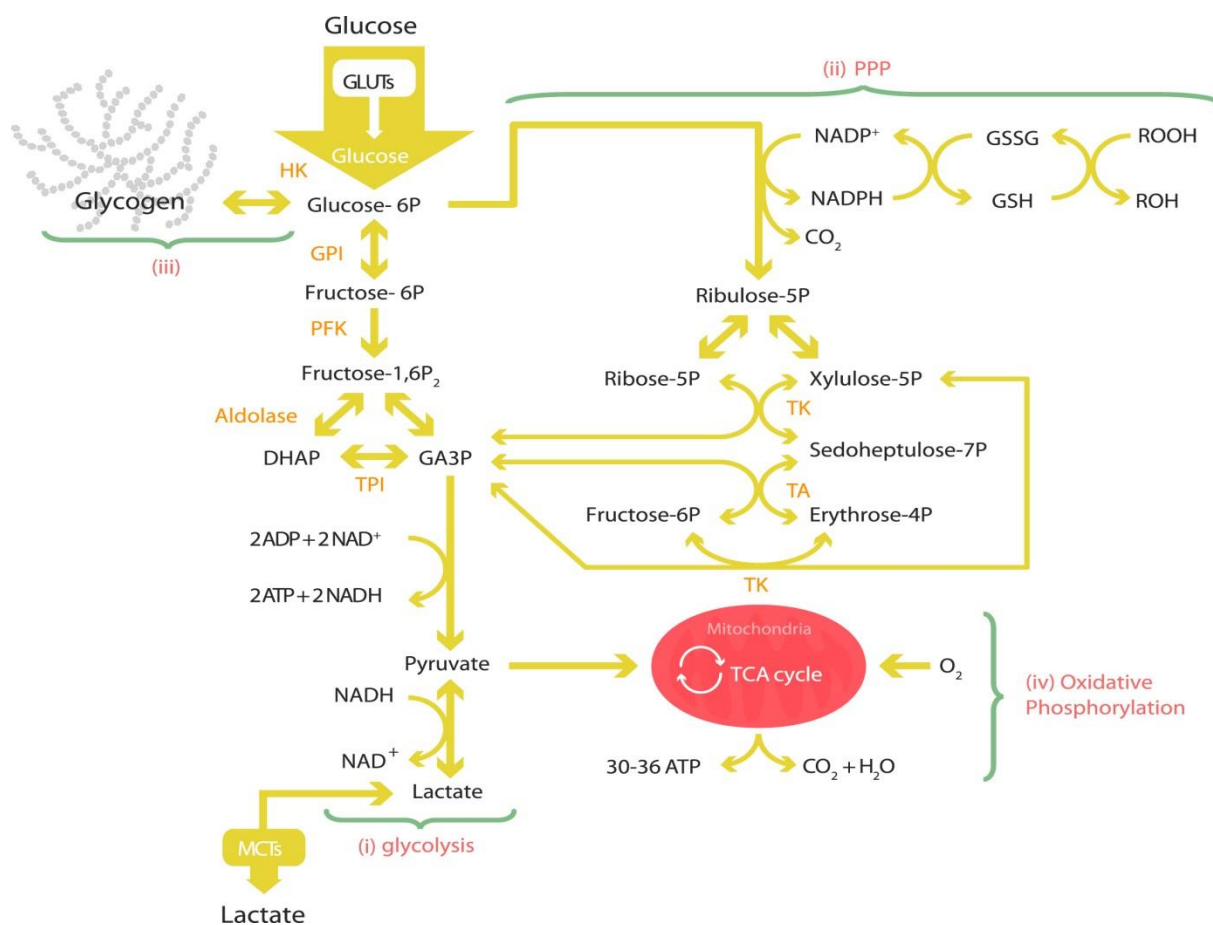


Figure 3. Métabolisme du glucose et ses trois voies.

Les voies astrocytaires principales sont : la glycolyse, avec formation de lactate en produit final et la formation de 2 ATP (i) et la glycogénogenèse, qui est exclusivement retrouvée dans les populations d'astrocytes, et sert à stocker le glucose-6-P sous forme de glycogène, ce qui permettra un usage ultérieur des ressources énergétiques ainsi mis en réserve (iii). La voie des pentoses phosphates est fortement exprimée chez les neurones, cette voie est à la fois anabolique (synthèse de nucléotides et d'acides aminés aromatiques) et métabolique (détoxification des ROS) (ii). La voie de phosphorylation oxydative est non réprimée dans les neurones et permet, via la chaîne respiratoire mitochondriale de créer de 30 à 36 ATP et la production d'H₂O et de CO₂ à partir de dioxygène.

Abréviations : HK, hexokinase ; glucose-6-P, glucose -6-phosphate ; GPI, glucose -6-phosphatase isomérase ; PFK, phosphofructokinase ; fructose-6-P, fructose -6-phosphate ; fructose -1,6-P₂, fructose -1,6-biphosphate ; DHAP, dihydroxyacetone phosphate ; TPI, triose phosphate isomérase ; GA3P, glycéraldéhyde -3-phosphate ; ribulose-5-P, ribulose -5-phosphate ; ribulose-5-P, ribulose -5-phosphate ; xylulose-5-P, xylulose -5-phosphate ; TK, translocase ; sedoheptulose-7-P , sedoheptulose -7-phosphate ; TA, transaldolase ; erythrose-4-P, erythrose -4-phosphate ; MCT, transporteurs d'acides monocarboxyliques. Figure issue de (Magistretti et Allaman, 2015).

En effet, l'entrée dans le cycle de l'acide tricarboxylique est fortement régulée par la pyruvate déshydrogénase (PDH), qui est déjà presque saturée en condition physiologique basale (Halim *et al.*, 2010). La PDH fait partie d'un complexe de trois enzymes qui permet d'obtenir depuis le pyruvate l'acétyl-coenzyme A nécessaire pour former du citrate après réaction avec l'oxaloacétate, et lancer ainsi la respiration cellulaire en présence d'oxygène gazeux (O_2) (Figure 4, 5 et 6). Il s'ensuivra que pour faire face à un besoin énergétique supplémentaire en regard de l'activité basale, comme une augmentation de l'activité neuronale, le glucose ne pourra plus être métabolisé par le processus de phosphorylation oxydative, et aboutira donc à la production de lactate. L'activité de la PDH diminue avec sa phosphorylation. En conditions basales cette enzyme, chez les astrocytes, a montré à un haut degré de phosphorylation (Zhang *et al.*, 2014 ; Itoh *et al.*, 2003). En effet, l'enrichissement dans le tissu glial (plus de 30 fois) du gène PDK4 codant pour le pyruvate déshydrogénase kinase 4, une isoenzyme, permet de maintenir l'enzyme PDH dans un état phosphorylé, donc moins actif (Zhang *et al.*, 2014). Dans l'astrocyte, en présence d'un taux de dioxygène physiologique, l'utilisation du glucose pour l'obtention du lactate est alors favorisée, et la voie de la phosphorylation oxydative est freinée.

En contraste avec ceci, les neurones possèdent une capacité limitée à favoriser la glycolyse aérobie, mais présentent à la place une forte activité oxydante du cycle de Krebs. Une enzyme glycolytique, la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (Pfkfb3), un effecteur positif de la glycolyse, est fortement réprimée par dégradation protéasomale dans les populations de neurones (Bolaños *et al.*, 2010). Ce mécanisme répressif n'est pas retrouvé chez les astrocytes. L'utilité de ce type de régulation fut démontrée expérimentalement avec l'inhibition de la dégradation protéasomale de Pfkfb3 (Bolaños *et al.*, 2010). L'utilisation du glucose dans le compartiment neuronal, qui en condition physiologique préfère la voie des pentoses se retrouve dans ces conditions à emprunter la voie de la glycolyse aérobie. Dans la mesure où la voie des pentoses présente des propriétés protectrices à l'encontre des ions superoxyde et autres dérivés réactifs à l'oxygène produit par l'activité oxydative du cycle de Krebs des neurones, grâce à la formation de NADPH nécessaire à la régénération du glutathion, les neurones exprimant la Pfkfb3 subissent un stress oxydatif aboutissant à l'apoptose. Ces résultats montrent

l'importance pour les neurones d'utiliser préférentiellement le glucose, non pas dans un but énergétique, mais pour produire des antioxydants qui garantiront une protection contre des activités oxydatives trop importantes (Figure 7).

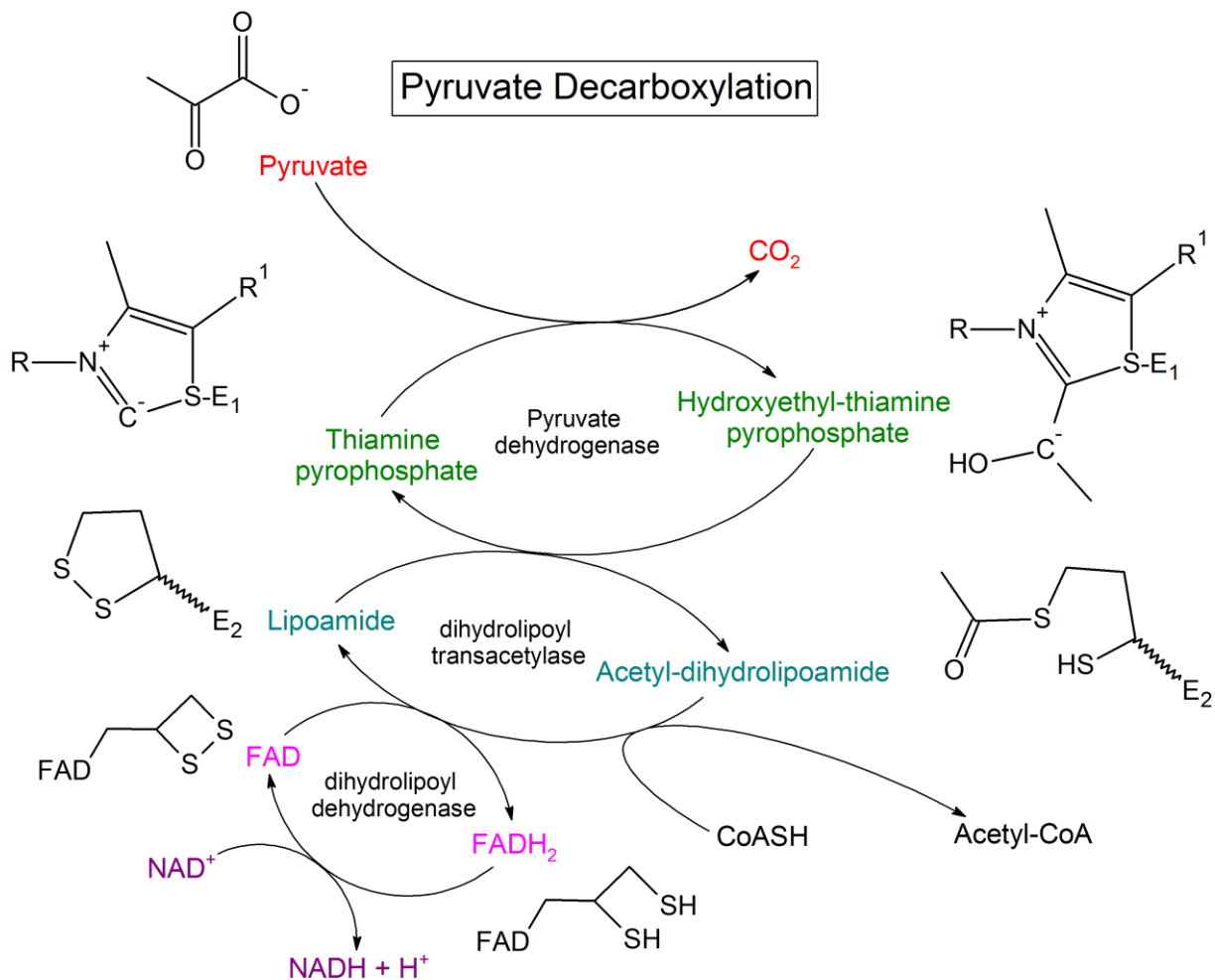


Figure 4. Décarboxylation du pyruvate.

Ensemble de réactions permettant d'engager l'entrée dans le cycle de Krebs (nommé aussi ; TCA ou cycle de l'acide citrique) le pyruvate, qui sera catalysé en acétyl-CoA, après trois étapes successives par les enzymes ; pyruvate déshydrogénase, dihydrolipoamide S-acétyltransférase, dihydrolipoyl déshydrogénase.

Abréviations : FAD/ FADH₂, Flavine adénine dinucléotide; NAD⁺/ NADH, nicotinamide adénine dinucléotide.

(Issue de : https://fr.wikipedia.org/wiki/D%C3%A9carboxylation_du_pyruvate)

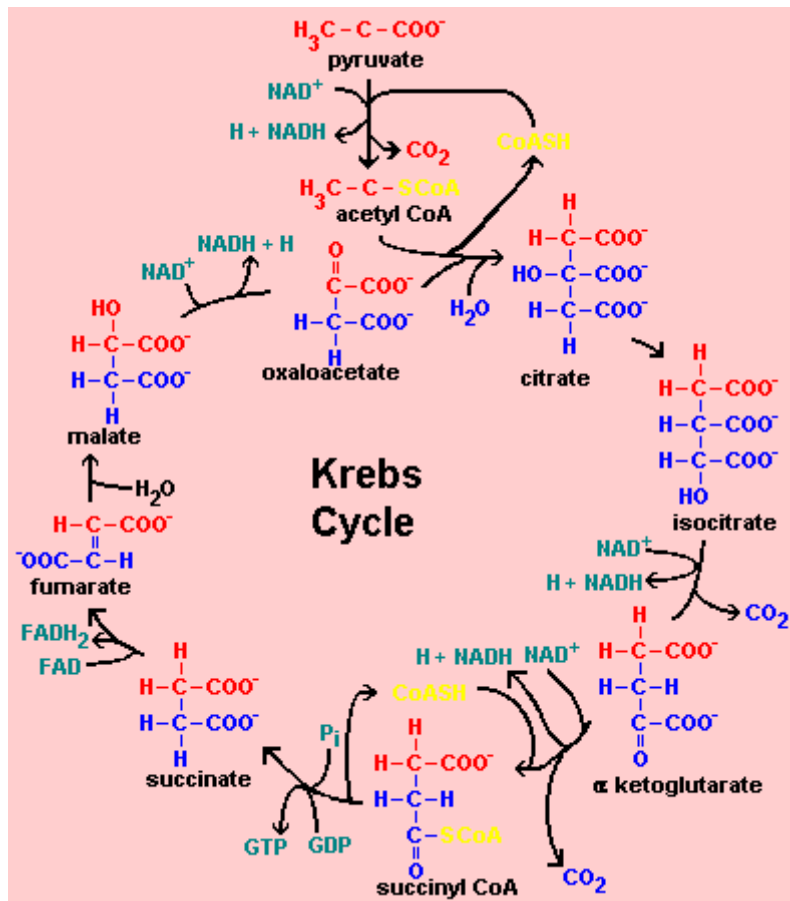


Figure 5. Devenir de l'acétyl-CoA dans le cycle de l'acide tricarboxylique.

En présence de dioxygène, l'acétyl-CoA sera complètement oxydé par ce cycle, et donnera au cours de ces étapes, des coenzymes tels que le NADH et FADH_2 (essentiels à la chaîne respiratoire mitochondriale pour produire de l'énergie), et du CO_2 , de l'ATP.

Abréviations : FAD/FADH_2 , Flavine adénine dinucléotide; NAD^+/NADH , nicotinamide adénine dinucléotide. CO_2 , dioxyde de carbone ; GTP, guanosine triphosphate ; P_i , phosphate inorganique ; H_2O , eau. (Issue de : <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS.htm>).

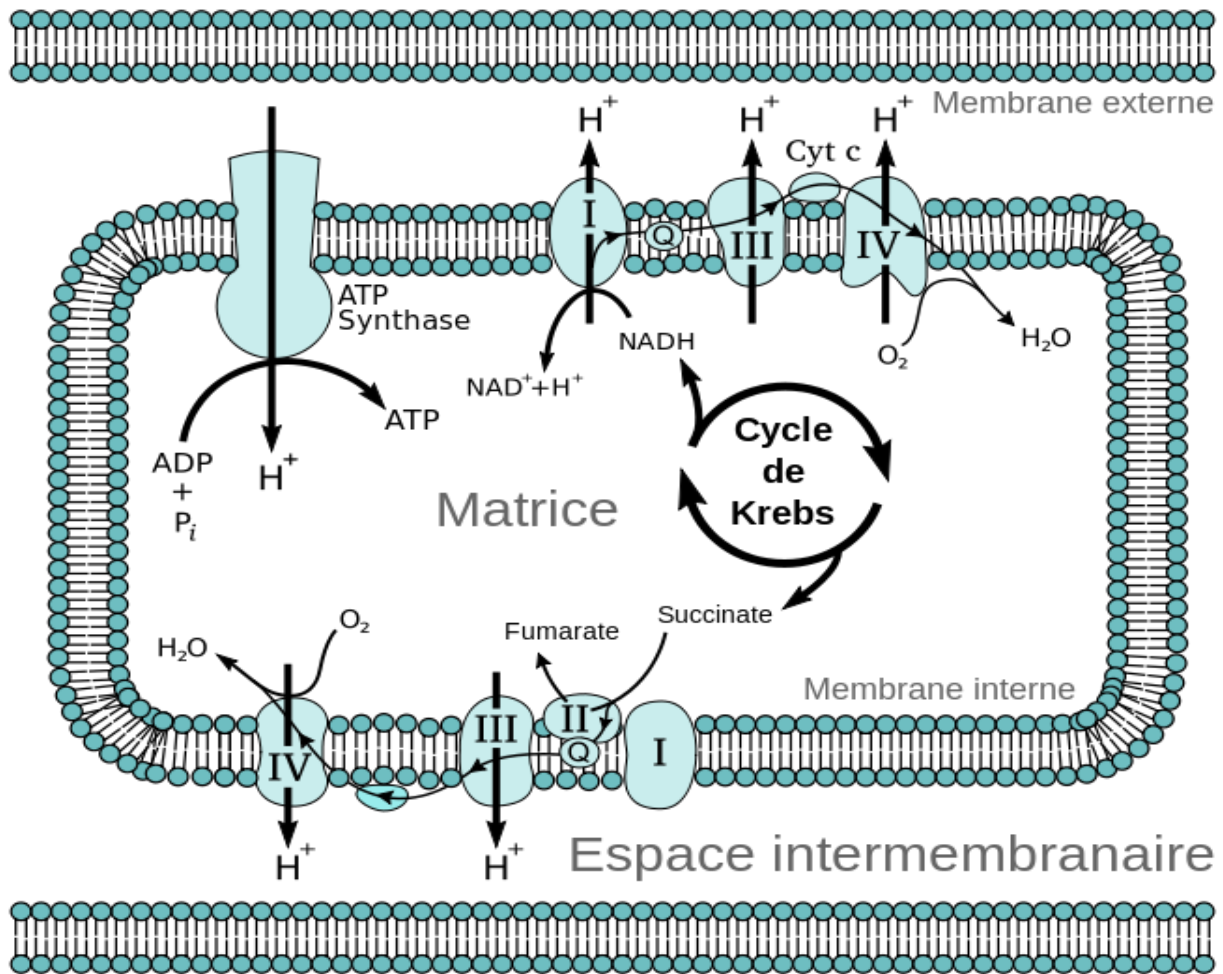


Figure 6. Représentation schématique des constituants de la chaîne respiratoire mitochondriale et de la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative.

Ces différents complexes protéiques permettront l'oxydation des coenzymes créés par le cycle de Krebs (NADH, au niveau du complexe I ; $FADH_2$, au niveau du complexe II) et donneront ainsi des électrons riches en énergie. Grâce à ces derniers, un gradient électrochimique de proton sera formé dans l'espace intermembranaire (par l'intermédiaire des complexes I, III, IV). L'énergie accumulée sous forme d'ions H^+ permettra via une pompe à proton « l'ATP synthase » de restituer cette énergie sous forme d'ATP. La production d'eau est réalisée par le complexe protéique IV, l'accepteur final des électrons, qui en réaction avec l'oxygène formera de l' H_2O .

Abréviations : Cyt c, cytochrome C; Q, coenzyme Q (ou ubiquinone); H^+ , proton; $FAD/FADH_2$, Flavine adénine dinucléotide; $NAD^+/NADH$, nicotinamide adénine dinucléotide; ATP, adénosine triphosphate; ADP, adénosine diphosphate; P_i , phosphate inorganique; H_2O , eau; O_2 , dioxygène.

(Issue de : https://fr.wikipedia.org/wiki/Respiration_cellulaire#Cycle_de_Krebs)

Une autre enzyme de la glycolyse, la pyruvate kinase catalyse la réaction de conversion du phosphoénolpyruvate en pyruvate. Elle existe en deux isoformes, PKM1 exprimée par les neurones et PKM2, astrocytaire (Zhang *et al.*, 2014). PKM2 peut en cas de forte demande énergétique répondre à ces besoins en augmentant la glycolyse (Zhang *et al.*, 2014 ; Ward et Thompson, 2012). Cette propriété n'est, une nouvelle fois, pas observée chez les neurones avec PKM1 (Figure 7) (Zhang *et al.*, 2014).

Une nouvelle différence entre les voies métaboliques des tissus neuronaux et astrocytaires est observée dans la dégradation de certains produits cytotoxiques. Un sous-produit dérivé de la glycolyse très réactif, le méthylglyoxal (MG), promeut l'accumulation cellulaire de produits de Maillard, nommé aussi produits terminaux de glycation (PTG). Ces PTG sont constitués, après plusieurs étapes biochimiques, de protéines glyquées non dégradables par le protéasome, et donc, de par leur toxicité entraîne la mort des cellules (Bélanger *et al.*, 2011b). Ces produits seraient associés à plusieurs maladies neurodégénératives (Münch *et al.*, 2012). Cependant, un mécanisme de détoxification du méthylglyoxal existe, par le biais de deux enzymes, la glyoxalase 1 (Glo-1) et la glyoxalase 2 (Glo-2) qui permettent, grâce à leur action séquentielle, d'aboutir à la production de D-lactate (Bélanger *et al.*, 2011b). Ces enzymes sont fortement exprimées dans les astrocytes, pas dans les neurones, et rendent ainsi les réseaux gliaux plus résistants aux MG et PTG. Elles fournissent *via* ce système de détoxification, une protection efficace du tissu nerveux (Figure 7 et 8) (Bélanger *et al.*, 2011b).

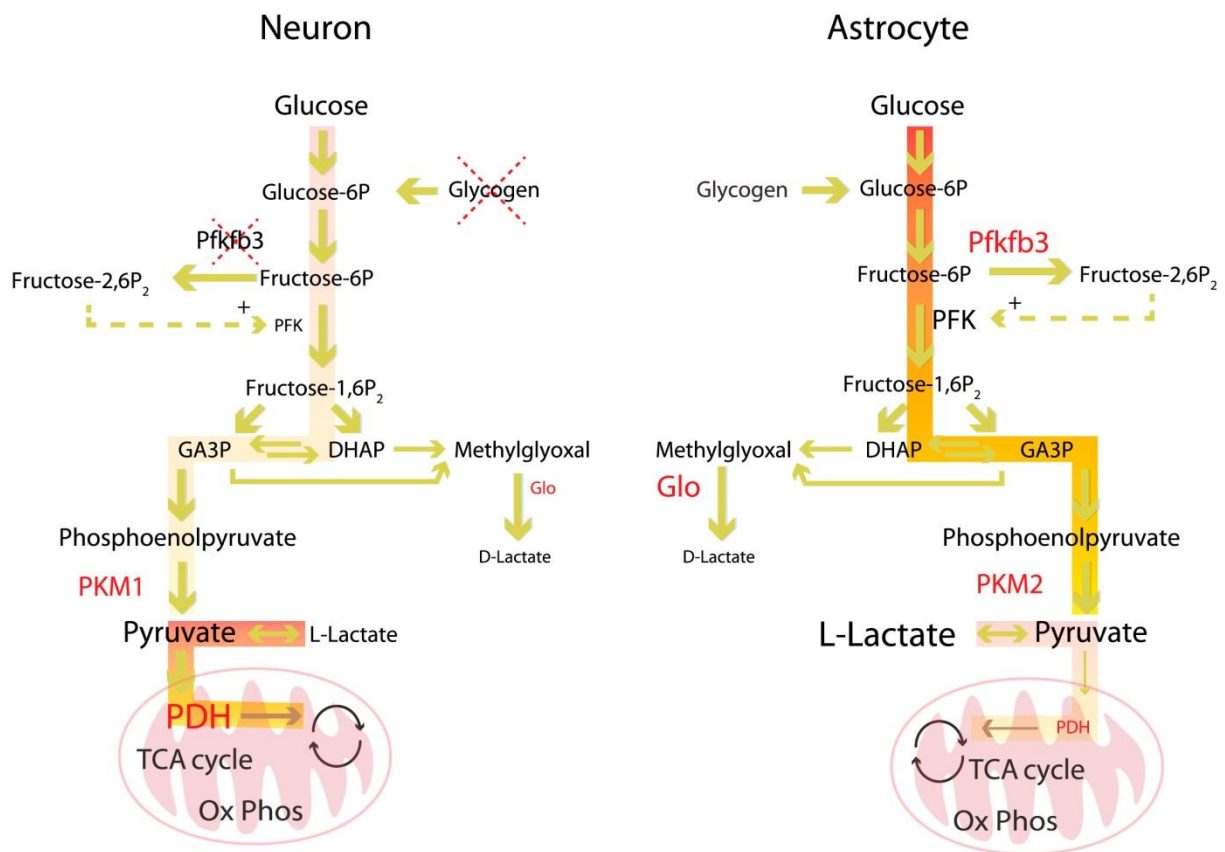


Figure 7. Voies récapitulatives des principales différences métaboliques observées entre neurones et astrocytes.

Les réserves de glycogènes sont exclusivement astrocytaires. L'enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (Pfkfb3), permettant une augmentation de l'activité glycolytique, est fortement présente au niveau des astrocytes, et réprimé chez les neurones. La production de lactate est encouragée par l'inhibition du pyruvate déshydrogénase (PDH) et par la capacité de l'enzyme pyruvate kinase 2 (PKM2) à réguler à la hausse la conversion de phosphoénolpyruvate en pyruvate chez les astrocytes. Au niveau des neurones, PKM1, ne possède pas cette propriété, mais un autre enzyme le PDH présente une forte activité catalytique qui permet au pyruvate de rejoindre le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA), afin de réaliser la respiration cellulaire mitochondriale et de produire de l'énergie. Le système de détoxification du méthylglyoxal réalisé par les enzymes Glo (Glo-1 et Glo-2) est fortement exprimé chez les astrocytes, en comparaison des neurones. L'utilisation préférentielle de ces voies par les différents types cellulaires se montre complémentaire, en termes de protection et d'approvisionnement énergétique.

Légende : glucose-6-P, glucose -6-phosphate; Pfkfb3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3; fructose -2,6 P₂, fructose -2,6-biphosphate; PFK, phosphofructokinase ; fructose-6-P, fructose -6-phosphate ; fructose -1,6-P₂, fructose -1,6-biphosphate ; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; GA3P, glycéraldéhyde -3-phosphate; Glo, glyoxalase; PKM, pyruvate kinase. Figure issue de (Magistretti et Allaman, 2015).

The Glyoxalase System

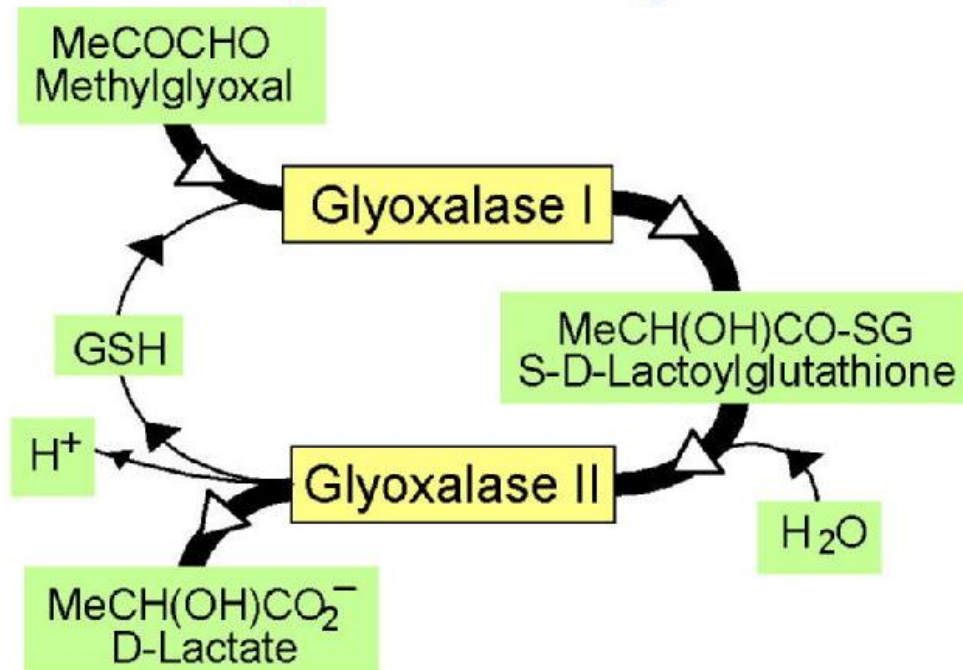


Figure 8. Le système de détoxification du méthylglyoxal.

Dégradation séquentielle du méthylglyoxal par les enzymes glyoxalase I et glyoxalase II. Le produit final est obtenu sous forme de D-lactate.

(Figure issue :

<http://www2.warwick.ac.uk/fac/med/research/tsm/mvhealth/proteindamage>)

1.3.2. Besoins énergétiques du cerveau

Les deux voies métaboliques complémentaires pour produire de l'énergie à partir du glucose sont, pour les neurones, l'utilisation de la voie des pentoses phosphates qui permettra la création de pouvoir réducteur sous forme de NADPH, nécessaire à la détoxification des produits issus des activités de phosphorylation oxydative de la matrice mitochondriale neuronale, et pour les astrocytes, la glycolyse aérobie, voie préférentielle pour la dégradation du glucose (Magistretti et Allaman, 2015). Même si ce type de cellule possède la capacité de produire de l'énergie par le cycle de Krebs, il engendrera comme principaux produits du lactate et pyruvate. Ainsi, le glucose métabolisé dans l'astrocyte fournira au neurone, par l'intermédiaire du lactate, un substrat énergétique qui sera oxydé pour former de l'ATP (Magistretti et Allaman, 2015).

Cependant, les besoins en énergie de ces cellules ne sont pas équivalents, les neurones consommeraient approximativement 80 % de l'énergie produite, le reste serait utilisé par les cellules gliales (Harris *et al.*, 2012 ; Hyder *et al.*, 2013). En effet, les potentiels d'action et potentiels synaptiques engendrent une dissipation du gradient électrochimique, qui doit être rétabli *via* des pompes ioniques coûteuses en énergie. Avec le but de mieux comprendre ces besoins et discriminer précisément où ces dépenses sont réalisées, plusieurs études ont montré que la majeure partie de l'énergie utilisée, plus de 80 %, étaient imputables au potentiel post-synaptique au niveau de l'hippocampe (Alle *et al.*, 2009). Les potentiels d'action quant à eux sont moins demandeurs en énergie, ceci peut être expliqué par le fait que les canaux sodiques et potassiques voltage dépendant, les deux principaux canaux impliqués dans la génération de potentiels d'action, ne présentent dans les axones myélinisés qu'une période d'activation courte, limitant ainsi la dissipation ionique et n'engendrant donc qu'une faible consommation d'énergie par la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase (Magistretti, 2009). Il a été montré qu'en outre du potentiel post-synaptique, une autre dépense énergétique majeure est le recyclage vésiculaire (Rangaraju *et al.*, 2014). En regard de ces informations et des distances séparant les synapses de la machine métabolique du corps cellulaire, il semble nécessaire d'avoir des mécanismes locaux capables de sentir les activités synaptiques et de fournir le cas échéant des substrats énergétiques supportant les demandent énergétiques des processus pré et postsynaptiques.

1.3.3. Couplage métabolique entre neurone et astrocyte

Les astrocytes sont des cellules appartenant à la classe des cellules macrogliales, initialement décrite par Virchow au XIX^{ème} siècle. Dans cette même période, Golgi leur attribua pour fonction la distribution de nutriments dans le parenchyme cérébrale. Ce type de cellule de forme sphérique, pour sa partie centrale, mesure de 80 à 100 µm de diamètre total, et possède de nombreux prolongements. En effet, ces prolongements entrent en contact avec les capillaires de la barrière hématoencéphalique pour assurer l'absorption des différents nutriments nécessaires aux bons fonctionnements du cerveau. D'autres prolongements entourent les neurones de façon dynamique et de par leur positionnement, sont sensibles aux activités synaptiques, permettant ainsi de réaliser localement un couplage entre les activités des neurones et leurs besoins en énergie (Pellerin et Magistretti, 1994). Grâce à un échange intercellulaire direct de molécules inférieures à 2KDa au travers des jonctions communicantes, les astrocytes forment entre eux des réseaux, nommés syncytium astrocytaires (Giaume *et al.*, 2010). Ils ont la particularité d'être compartimentés dans des régions précises et leur étendue ainsi que la forme de ces réseaux métaboliques astrocytaires s'adaptent aux activités neuronales (Rouach *et al.*, 2008).

En 1994, le groupe de Pierre Magistretti décrit un mécanisme permettant le couplage neurone-glie, nommé « la navette lactate astrocyte-neurone », qui permet d'adapter les activités synaptiques aux apports énergétiques. Dans cette étude les auteurs montrent que l'application de glutamate stimule la capture de glucose et la production de lactate par les astrocytes. La glycolyse aérobie est en effet déclenchée par la recapture du glutamate, une des principales fonctions des astrocytes (Pellerin et Magistretti, 1994). Une molécule de glutamate cotransportée (transporteur GLT-1 et GLAST) dans le compartiment astrocytaire avec trois ions Na⁺ change le gradient sodique, déclenchant alors la pompe Na⁺-K⁺ ATPase qui devra consommer une molécule d'ATP pour extruder trois ions Na⁺. La conversion dans l'astrocyte d'une molécule de glutamate en glutamine par l'enzyme glutamine synthase coûtera une molécule d'ATP supplémentaire, et impliquera donc une augmentation de la glycolyse aérobie. La glutamine formée sera largement re-transportée vers le compartiment présynaptique, en effet ce mécanisme permet de reconstituer une

grande partie du glutamate présynaptique (Bak *et al.*, 2006 ; McKenna, 2007 ; Stobart et Anderson, 2013). Le glutamate non converti en glutamine sera utilisé, après conversion en α -cétoglutarate, par le cycle de Krebs astrocytaire. Il est à noter que la capture astrocytaire de glutamate acidifie la matrice mitochondriale; la dissipation du gradient entre cytosol et matrice aura pour conséquence une diminution de l'activité oxydative phosphorylante de la mitochondrie astrocytaire (Azarias *et al.*, 2011). Cette consommation d'ATP par l'astrocyte va créer un bilan énergétique négatif qui devra être comblé par l'absorption de glucose au niveau de la barrière hématoencéphalique, et *via* une augmentation de son activité glycolytique pour répondre à ces besoins.

Plusieurs autres éléments semblent également réguler positivement la glycolyse aérobie astrocytaire tels que l'acide arachidonique, la noradrénaline et le potassium. Il a été montré que l'augmentation extracellulaire de potassium suivant l'activité neuronale, pouvait avoir rapidement un effet glycolytique (de l'ordre de quelques secondes, >300 %), *via* un cotransporteur NBCe1 (électrogénique sodium bicarbonate cotransporteur) qui implique le transport d'ions $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (Bittner *et al.*, 2011 ; Ruminot *et al.*, 2011 ; Choi *et al.*, 2012). La glycogénolyse peut également être stimulée par des neurotransmetteurs comme la noradrénaline et le peptide vasoactif intestinal (Sorg *et al.*, 1995 ; Sorg et Magistretti, 1991). D'autres neuromodulateurs tels que l'ATP et l'adénosine pourrait avoir un effet sur la synthèse de glucose à partir du glycogène (Figure 9).

Le lactate produit par cette voie astrocytaire, transitera vers les neurones par des transporteurs d'acides monocarboxyliques (MCT) perméables au lactate, pour finalement, après conversion en pyruvate, être oxydé dans la mitochondrie neuronale et donner 14 à 17 ATP par molécule de lactate. Les transporteurs MCT-1 et MCT-4 sont impliqués au niveau glial dans le relargage du lactate, et le transporteur MCT-2, exclusif des neurones, sera utilisé pour sa recapture (Figure 10) (Halestrap, 2013 ; Pierre et Pellerin, 2005). L'enzyme LDH, tétramère formé par deux sous-unités A et B, est exprimée de manière différentielle chez les neurones et astrocytes selon ces sous-unités. La première forme génique *ldha* assure la conversion du lactate en pyruvate dans les neurones (isoenzyme LDH1), tandis que la seconde *ldhb* permet la

catalyse du pyruvate en lactate dans les astrocytes (isoenzyme LDH5) (Bittar *et al.*, 1996).

Dans leur ensemble, ces éléments indiquent que le mécanisme de « navette lactate astrocyte-neurone » permet de répondre après capture du glutamate synaptique aux neurones activés et déclenche ainsi, au niveau des astrocytes, l'importation de glucose et sa métabolisation en lactate pour pouvoir subvenir aux besoins énergétiques principalement induits par les potentiels postsynaptiques. De retour dans des conditions d'activités basales, un changement métabolique apparaît, l'utilisation de la glycolyse aérobie astrocytaire est remplacée par la voie des pentoses phosphates neuronale, l'utilisation du glucose sera ainsi principalement dédiée à la production de NADPH.

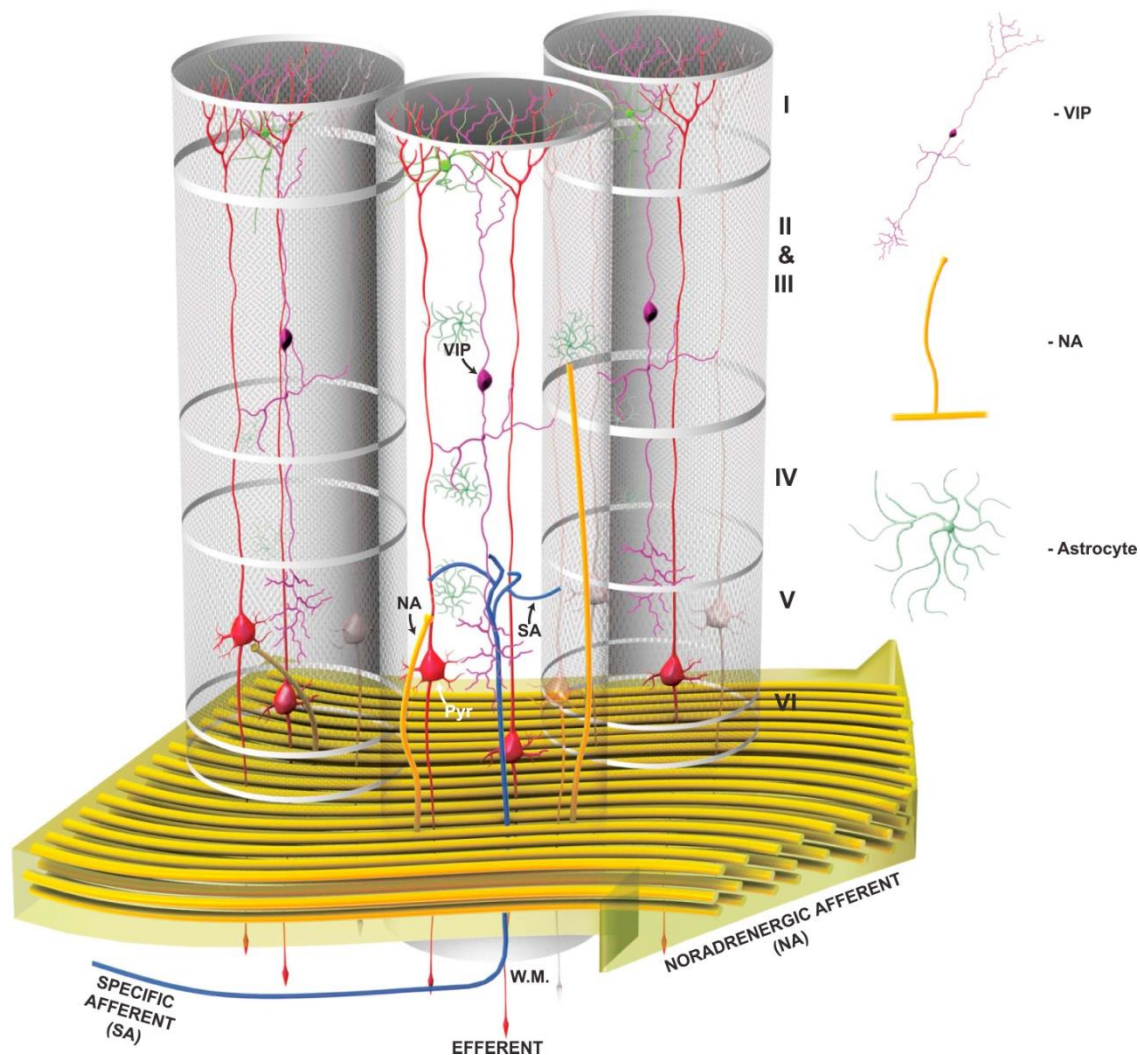


Figure 9. Effets glycolytiques des neurones VIP et des fibres noradrénergiques dans le néocortex.

Dans le cortex est un grand consommateur d'énergie, 85 % de ses synapses seraient glutamatergiques. La mobilisation des réserves de glycogènes dans cette partie du cerveau serait également assurée par le peptide vasoactif intestinal (VIP) et les afférences noradrénergiques (NA). L'organisation des neurones VIP respecte l'arrangement spatial en colonne du cortex, leurs activations sont dues aux afférences thalamo-corticales (SA), alors que les fibres noradrénergiques peuvent innervier les domaines corticaux de manière horizontale et toucher ainsi une vaste étendue de néocortex. Pyr, cellule pyramidale ; I-VI, couches du cortex ; WM, matière blanche. Figure issue de (Magistretti et Allaman, 2015).

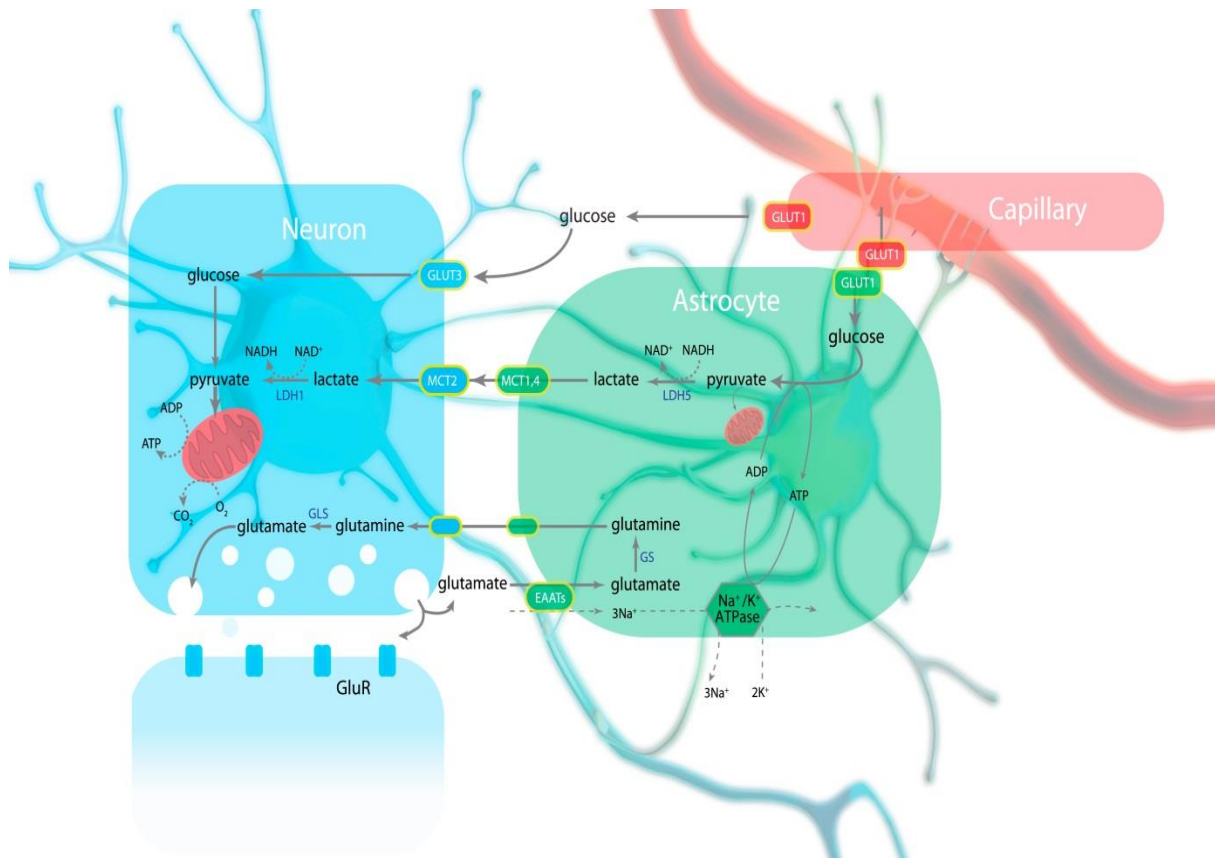


Figure 10. Illustration des principales voies énergétiques entre capillaire, astrocyte et neurone.

Des besoins énergétiques sont créés par l'activation des récepteurs glutamatergiques (GluR) postsynaptiques. Pour répondre à ceci, le mécanisme de la navette lactate astrocyte-neurone, via la machinerie intracellulaire de l'astrocyte va pouvoir augmenter la capture du glucose à travers la barrière hématoencéphalique. Pour ce faire, de nombreuses étapes doivent être réalisées. La recapture du glutamate provenant de la fente synaptique est réalisé par un cotransport 1glutamate/3Na⁺ (EAAT ; principalement GLT-1 et GLAST). Le déséquilibre sodique engendré par ces entrées va devoir être rétabli par l'activation d'une pompe Na⁺-K⁺ ATP_{ase} consommatrice d'énergie. Le glutamate internalisé pouvoir être transporté vers les neurones, après transformation en glutamine via l'enzyme glutamine synthase, autre processus coûteux en énergie, et ainsi revenir sous forme de glutamate par action de l'enzyme glutaminase. Cette perte d'énergie supplémentaire devra être compensée par une entrée de glucose par GLUT1, exprimé au niveau de l'astrocyte et du capillaire. La glycolyse aérobie métabolisera les glucoses captés en lactate par l'intermédiaire de la déshydrogénase 5 (LDH5) astrocytaire, qui catalysera la transformation du pyruvate. Le lactate migrera à travers les transporteurs d'acide monocarboxylique (MCT1/4 pour les astrocytes et MCT2 au niveau des neurones), pour ensuite être catalysé en pyruvate sous l'action de l'enzyme LDH1. Sans excitation, donc en condition basale, les neurones pourront utiliser le glucose via le transporteur GLUT3. Figure issue de (Magistretti et Allaman, 2015).

1.3.4. Voies métaboliques utilisant d'autres substrats non glucidiques

1.3.4.1. La β -oxydation

Cette voie catabolique des acides gras est activée lors du jeûne. Dans un premier temps, elle nécessite la lipolyse des lipides sous forme de triglycéride dans les tissus adipeux par l'intermédiaire de lipases, les produits résultants de cette dégradation sont 3 acides gras et 1 glycérol. Cependant une fois libérés, ces acides gras libres doivent pour pouvoir rentrer dans la matrice mitochondriale et être par la suite métabolisés de façon différentielle selon leur taille. En effet, les acides à chaîne courte peuvent passer librement dans la matrice mitochondriale, pour ensuite être activés par liaison à une coenzyme A (Nalecz KA et Nalecz MJ, 1993). L'utilisation d'acides gras libres à chaîne longue nécessite des transformations supplémentaires notamment au niveau cytosolique. La première étape est catalysée par une enzyme « l'Acyl CoA synthétase », et donne à partir d'un acide gras « activé », un Acyl-CoA. Se met en place ensuite un système de transfert par le biais de la navette carnitine, qui grâce à deux enzymes CPTI (Carnitine Palmitol Transferase I) et CPTII (Carnitine Palmitol Transferase II), permet l'internalisation de ce type d'acide gras. CPTI assure la conversion de l'Acyl-CoA en Acyl-carnitine, le passage de cette molécule se fait dans la membrane externe de la mitochondrie par une porine, le franchissement de la membrane mitochondriale interne est réalisé *via* une translocase qui permet l'échange de l'acyl-carnitine contre une carnitine venant de la matrice. Puis le CPTII catalyse la réaction inverse de CPTI, en libérant la carnitine et récupérant une coenzyme A, l'Acyl-CoA est ainsi récupéré (Figure 11) (Nalecz KA et Nalecz MJ, 1993).

Dans la matrice mitochondriale, l'hélice de Lynen consiste en une séquence de quatre réactions enzymatiques, qui découpe tous les deux carbones l'acide gras par répétitions successive sur le carbone β , pour donner à chaque cycle 1 FADH_2 , 1 NADH et 1 Acétyl-CoA (Nalecz KA et Nalecz MJ, 1993). À titre indicatif, l'oxydation complète d'un acide palmitique à 16 carbones donne au total 129 ATP. En regard de l'apport énergétique conféré par une molécule de glucose (entre 30 et 36 ATP), la β -oxydation permet d'une part, de facilement mobiliser le stock de lipides qui représente une grande réserve calorifique, et d'autre part, d'obtenir un rendement énergétique supérieur à l'oxydation du glucose.

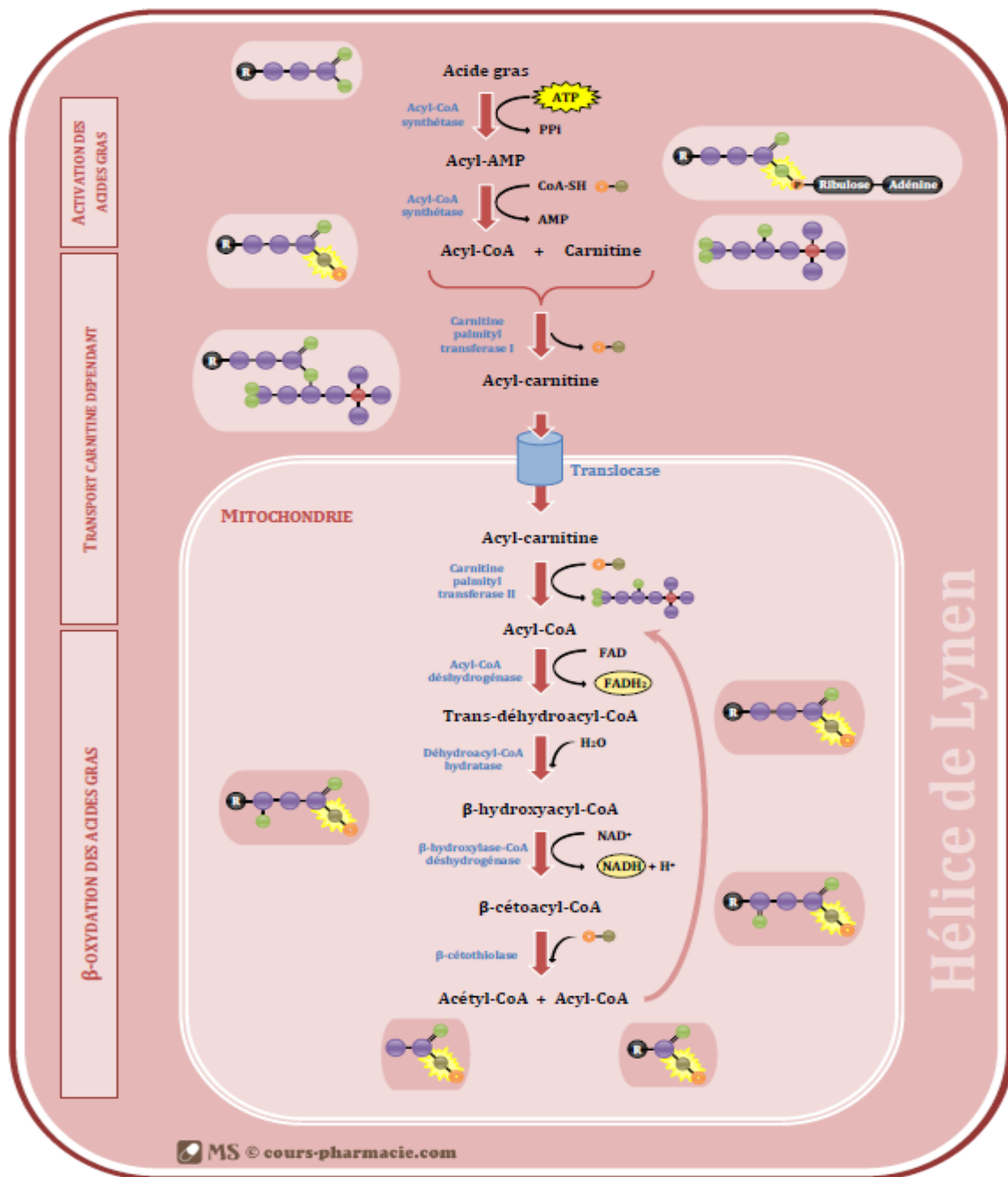


Figure 11. Schéma des différentes phases séquentielles permettant l'obtention d'énergie par la mobilisation d'acide gras.

L'oxydation complète d'une molécule d'acide gras nécessite, après libération de lipides stockés dans le tissu adipeux, une phase d'activation, qui, si l'acide gras est à chaîne longue, se fera dans le cytoplasme cellulaire. Dans le cas d'acide gras à chaîne courte, celle-ci se réalisera dans la matrice mitochondriale, après une simple diffusion au niveau des membranes. Le passage des acides gras à chaîne longue, quant à lui demande un passage par un mécanisme de transport, ce dernier est assuré par un système de navette carnitine, puis comme son homologue à chaîne courte, subira via l'intervention de plusieurs enzymes, une dégradation complète dans le cycle de l'acide tricarboxylique.

1.3.4.2. Métabolismes des corps cétoniques

Les corps cétoniques sont trois molécules, l'acétone, le bêta-hydroxybutyrate et l'acétoacétate. Ils sont issus de l'oxydation des acides gras dans le foie en période prolongée de jeûne, une fois que les réserves en glycogène dans le muscle ou le foie ont été épuisées. La production de corps cétoniques peut être rencontrée dans de nombreux processus physiologique, par exemple après un exercice physique soutenu, pendant la période néonatale ou dans un régime à bas index glycémique (Cotter *et al.*, 2013)

Ordinairement les acides gras libérés par la lipolyse sont convertis en acétyl-CoA, puis oxydés par le cycle de l'acide tricarboxylique. Par ce biais, il est alors possible d'accéder à une grande quantité d'énergie stockée depuis les adipocytes, tissu qui regroupe plus de 80 % des réserves énergétiques humaines (Berg *et al.*, 2012). Cependant dans certaines situations, comme celles énumérées ci-dessus, la libération d'acides gras devient trop importante et dépasse la capacité d'oxydation mitochondriale, la production acétyl-CoA est détournée et utilisée pour la cétogenèse, ce qui permettra par la suite d'assurer un apport en énergie, *via* la circulation sanguine, aux tissus périphériques métaboliquement actifs tels que les muscles et le cerveau. La contribution des corps cétoniques varie en fonction de la durée du jeûne, leurs concentrations peuvent atteindre près d'un millimolaire après une période de 16 heures de restriction, au bout de deux jours 2mM et de 6 à 8 mM en période de jeûne prolongée (Cahill *et al.*, 1966 ; Robinson et Williamson, 1980 ; Cahill, 2006). L'exercice physique peut quant à lui engendrer après 90 min d'effort intense, une concentration en β -hydroxybutyrate de 1 à 2mM. A l'état basal, chez l'homme, elle est d'environ 50 μ M (Koeslag *et al.*, 1980 ; Cahill, 2006).

Pour ce faire, la cétogenèse emprunte les premières étapes de la bêta-oxydation, le changement de voie métabolique a lieu après condensation d'une molécule acétoacétyl-CoA avec un acétyl-CoA, réaction catalysée par l'enzyme HMGCS2 et donnant de manière irréversible du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA). L'acétoacétyl-CoA est obtenu à partir de deux molécules d'acétyl-CoA sous l'action de l'enzyme β -cétotiolase. Toujours de manière irréversible, l'HMG-CoA formera de l'acétoacétate *via* l'enzyme HMGCL, une lyase qui libérera un acétyl-CoA.

L'acétoacétate est le précurseur de deux autres corps cétoniques, le β -hydroxybutyrate et l'acétone. Ce dernier sera dégradé spontanément et évacué, après passage dans le sang, dans l'air par expiration au niveau des poumons. Le β -hydroxybutyrate, corps cétonique le plus abondant, est obtenu par la conversion de l'acétoacétate par l'enzyme β -hydroxybutyrate déshydrogénase (BDH1), qui oxyde du NADH₂ en NAD⁺; il s'agit d'une réaction réversible qui dépend de la concentration de ces cofacteurs, la présence de NADH favorisant la formation de β -hydroxybutyrate. L'export des corps cétoniques du foie vers les tissus cibles se fait par l'intermédiaire de transporteurs d'acides monocarboxyliques (MCT6, gène *Slc16a6*) au niveau hépatique et leurs entrées au niveau des tissus, par les transporteurs MCT1/2 (Newman et Verdin, 2014).

Une fois internalisé, le β -hydroxybutyrate est converti en acétoacétate sous l'action de BDH1, réaction inverse de celle produite dans la matrice mitochondriale hépatique. Puis l'acétoacétate nouvellement formé est catalysé par le biais de l'enzyme OXTC1 (succinyl-CoA : 3-oxoacid-CoA transférase, aussi connu sous le nom de SCOT), qui récupérera un coenzyme A depuis un succinyl-CoA, et donnera en produit final de cette réaction de l'acétoacétyl-CoA. A cette étape, l'acétoacétyl-CoA sera clivé par la β -cétotiolase en deux acétyl-CoA qui pourront par la suite intégrer le cycle de Krebs (Figure 12) (Newman et Verdin, 2014).

L'étape limitante dans cette voie métabolique est la réaction catalysée par HMGCS2 pour donner du HMG-CoA au niveau hépatique (Hegardt, 1999). Cependant, il existe des régulations pouvant agir depuis ce niveau et en aval. La transcription du gène *Hmgcs2* peut être activée par la liaison au niveau de son promoteur du facteur de transcription FOXA2, sous le contrôle de deux hormones, l'insuline et le glucagon. La première inactivera FOXA2 par phosphorylation, la seconde activera FOXA2 par le complexe d'acétylation p300 (Wolfrum *et al.*, 2003 ; von Meyenn *et al.*, 2013). Une autre voie de régulation transcriptionnelle de *Hmgcs2*, implique PPAR α (récepteur nucléaire d'activation et de prolifération des péroxysomes) et sa cible le FGF20 par l'intermédiaire du gène *Fgf21* (facteur de croissance des fibroblastes) et mTORC1 (cible de la rapamycine chez les mammifères) (Hegardt, 1999 ; Badman *et al.*, 2007 ; Sengupta *et al.*, 2010). PPAR α et *Fgf21* sont fortement exprimés en période de jeûne ou pendant la diète cétogène. De plus, il a été constaté qu'en l'absence

d'au moins un de ces éléments une réduction de la cétogenèse est observée (Badman et al., 2007 ; Badman et al., 2009). La signalisation PPAR α est placée sous le contrôle inhibiteur du complexe enzymatique mTORC1; l'inhibition de mTORC1 est requise pour activer PPAR α , qui a son tour activera FGF21 (Badman et al., 2007 ; Sengupta et al., 2010).

L'activité de HMGCS2 est également régulée post-traductionnellement par acétylation, son activation après désacétylation est réalisée par SIRT3, qui lui est rencontré dans de nombreuses voies métaboliques du jeûne (Shimazu et al., 2010). Il a été montré chez la souris pendant le jeûne que sans cet enzyme, la concentration plasmatique de β -hydroxybutyrate est réduite (Shimazu et al., 2010). De manière intéressante, les nombreuses enzymes impliquées dans la cétogenèse sont acétylées, et contiennent au moins un site de désacétylation *via* SIRT3 (Hebert et al., 2013 ; Rardin et al., 2013). Il a été aussi rapporté que la succinylation de HMGCS2 pouvait réduire son activité (Quant et al., 1990).

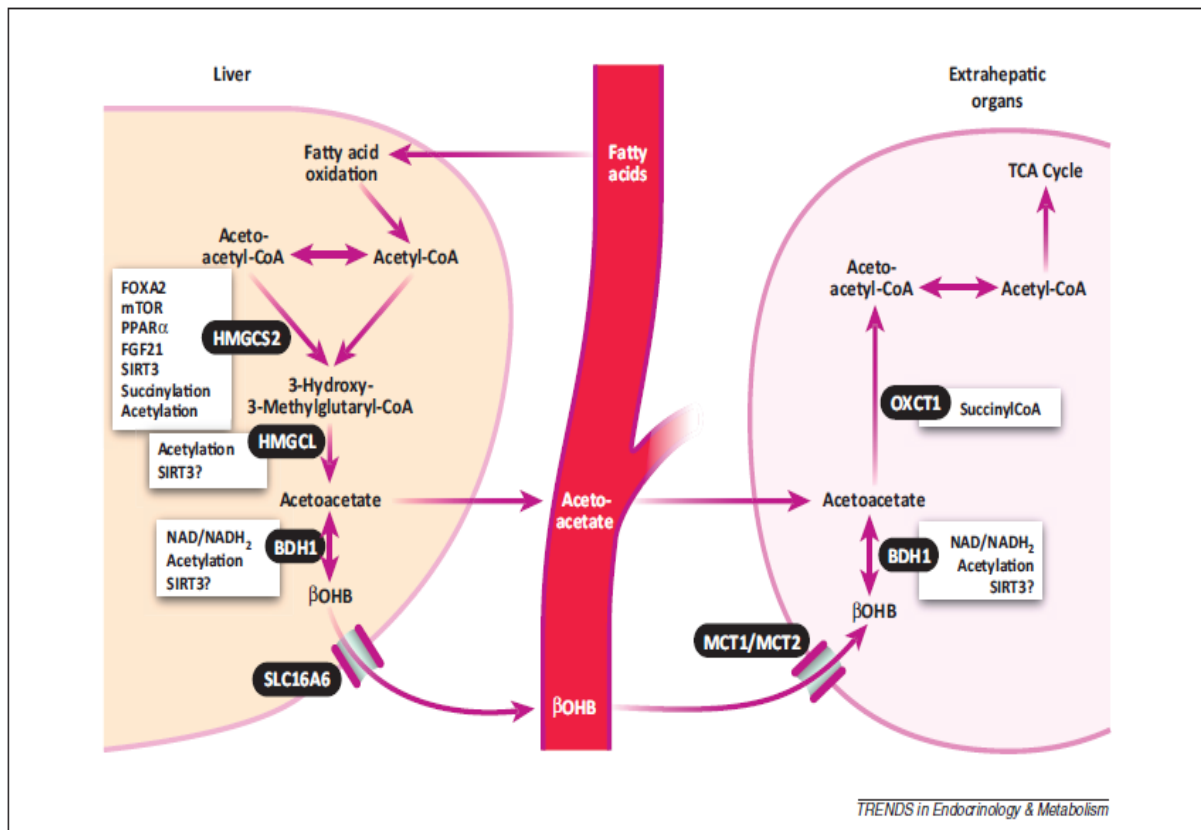


Figure 12. Voie métabolique des corps cétoniques et leurs régulations.

De nombreuses régulations peuvent être rencontrées dans le foie, mais aussi dans le tissu cible, celles-ci agissant au niveau transcriptionnel et post-traductionnelle, notamment par des enzymes régulant des mécanismes d'acétylation et de succinylation. La disponibilité de cofacteurs tels que NAD/NADH₂ pour l'enzyme BDH1 influencerait le sens de réaction de la catalyse. Enfin, il est représenté le chemin métabolique à travers les différents tissus qui conduira à la production d'énergie.

Abréviations ; BDH1, β -hydroxybutyrate déshydrogénase ; FGF21, facteur de croissance des fibroblastes ; FOXA2, forkhead box A2 ; HMGCS2, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HG)-CoA synthase 2 ; HMGCL, HMG-CoA lyase ; MCT1/2, transporteurs d'acides monocarboxyliques 1/2 ; mTOR, cible de la rapamycine chez les mammifères ; OXCT1, succinyl-CoA : 3-oxoacid-CoA transférase ; PPAR α , récepteur α nucléaire d'activation et de prolifération des péroxysomes ; SIRT3, sirtuin 3 ; SLC16A6, membre des transporteurs d'acides monocarboxyliques 6 ; TCA, cycle de l'acide tricarboxylique. (Figure issue de Newman et Verdin, 2014)

1.4. Rationnel de l'étude

Bien que les mécanismes sous-tendant l'action protectrice du régime cétogène soient encore mal connus, il a été proposé que la réduction de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH), une enzyme de la glycolyse, serait suffisante pour inhiber l'apparition des crises (Sada *et al.*, 2015). Ceci impliquerait que le facteur important aux vertus thérapeutiques protectrices n'est pas tant la présence de corps cétoniques, mais plutôt la réduction drastique du glucose, cette dernière menant à un fort ralentissement de la voie métabolique impliquant la LDH. Conformément avec ceci, une corrélation entre concentration sérique de corps cétoniques (beta-hydroxybutyrate et acétoacetate) avec le contrôle des crises est loin d'être apparente (McNally et Hartman, 2012).

De façon intéressante, différentes stratégies alimentaires ont été récemment proposées en vue de modifier ou remplacer la diète cétogène classique pour un régime moins restrictif qui conserverait encore des propriétés antiépileptiques. Une des premières modifications de la diète cétogène a consisté à remplacer une partie des lipides fournies sous forme d'acides gras à longues chaînes (14 à 24 atomes de carbone), par des acides gras à chaînes moyennes (6 à 12 atomes de carbone) (Huttenlocher *et al.*, 1971). Ces derniers présentent en effet un pouvoir cétogène plus grand, car ils sont absorbés plus efficacement et directement par le foie *via* la veine porte. La version initiale de cette diète apportait 60 % de l'énergie sous forme de triglycérides à chaîne moyenne, garantissant ainsi une forte cétose. Cependant, un tel apport de triglycérides à chaîne moyenne provoquait fréquemment des douleurs abdominales et des troubles gastro-intestinaux (Huttenlocher, 1976 ; Mak *et al.*, 1999 ; Sills *et al.*, 1986 ; Trauner, 1985).

Ce régime cétogène riche en triglycérides à chaînes moyennes a donc été modifié pour intégrer une proportion égale de triglycérides à chaînes longues (Schwartz *et al.*, 1989). L'utilisation des acides gras polyinsaturés peut également être bénéfique contre les crises, comme il a été montré, principalement, avec les acides gras oméga 3 chez les animaux (Porta *et al.*, 2009 ; Voskuyl *et al.*, 1998 ; Yehuda *et al.*, 1994) et humain (DeGiorgio *et al.*, 2015 ; Schlanger *et al.*, 2002), bien que leur réel efficacité chez les patients prête encore débat (Bromfield *et al.*, 2008 ; Yuen *et al.*, 2012).

Une approche alternative a été de cibler les glucides, non par leur restriction, mais qualitativement, en s'assurant que le pouvoir glucidique des différents aliments utilisés n'entraîne pas d'élévation de glucose sanguin important. Plusieurs essais cliniques ont rapporté que de tel traitement à index glycémique bas permettent de fournir de bonnes protections contre les crises (Muzykewicz *et al.*, 2009 ; Pfeifer et Thiele, 2005 ; Pfeifer *et al.*, 2008), malgré une cétose qui peut être faible et variable par rapport au régime cétogène. En conséquence, l'efficacité du traitement à index glycémique bas n'est pas corrélée avec le degré de cétose, mais plutôt avec la chute de la concentration sanguine en glucose (Muzykewicz *et al.*, 2009). Enfin, des études intéressantes ont suggéré que le ratio entre acides aminés ramifiés (BCAA pour branched chained amino acids) et aromatique (AAA) dans le sang influencent l'excitabilité des réseaux neuronaux centraux (Evangeliou *et al.*, 2009 ; Jirapinyo *et al.*, 2004). Les BCAA, leucine, isoleucine et valine favoriseraient la mise en place d'une cétose, ainsi que de la synthèse de GABA et réduiraient les niveaux de glutamate (Evangeliou *et al.*, 2009 ; Hutson *et al.*, 2001). En conséquence, un ratio sanguin important de BCAA/AAA a été recommandé pour diminuer l'excitabilité cérébrale, favorisant alors le contrôle des crises (Jirapinyo *et al.*, 2004).

Dans la présente étude nous avons recherché à développer une diète saine et palatable possédant des propriétés antiépileptiques, grâce à une approche combinant différentes stratégies nutritionnelles. Cette nouvelle diète combinée (CD) favorise les acides gras à chaînes moyennes, les acides gras polyinsaturés, les glucides à faible index glycémique, et un ratio élevé de BCAA/AAA. Nous avons d'abord déterminé si la CD pouvait induire une baisse de la régulation excitatrice comparable au régime cétogène traditionnel (Juge *et al.*, 2010 ; Sada *et al.*, 2015). L'efficacité antiépileptique de la CD a ensuite été testée sur la susceptibilité aux crises aiguës induites avec le pentylènetétrazole (PTZ), et de façon chronique avec le Kaïnate (KA) chez la souris, modèle couramment utilisé pour mimer l'épilepsie du lobe temporal. Les corrélats moléculaires et histologiques des crises induites par le KA ont également été comparés entre les différentes diètes.

2. Méthodes

2.1. Animaux

Les expérimentations ont été réalisées en accord avec les directives recommandées par le conseil de la communauté européenne, en date du 01/01/2013 (2010/63/EU), et par notre comité interne d'éthique (Centre pour la Recherche Interdisciplinaire en Biologie au Collège de France). Les expérimentations ont été réalisées sur des souris mâles sauvages C57BL/6j de 6 à 12 semaines. Tous les efforts ont été faits pour causer le moins de souffrance possible pour ces animaux et en réduire au maximum le nombre utilisé.

2.2. Diètes

Les souris ont été nourries soit avec un régime standard (SD), CD ou KD. Le SD a été fourni par Teklad (diète référence 2018), KD par Bioserv (référence F3666), le CD par PILEJE.

2.3. Analyses biochimiques des marqueurs de la cétose et de la glycolyse

Les niveaux de glucose, lactate, pyruvate, β -hydroxybutyrate, et acétoacetate ont été mesuré sur 500 μ l de sang (prélevé par ponction intracardiaque après anesthésie de l'animal au pentobarbital et déproteiné avec 1 volume d'acide perchlorique) en utilisant la méthode enzymatique de spectrophotométrie décrit dans Blau *et al.*, 2008.

2.4. Électrophysiologie *ex vivo*

Des tranches d'hippocampe (400 μ m) coupées transversalement ont été préparées comme décrit précédemment (Dallérac *et al.*, 2016 ; Milnerwood *et al.*, 2006). Brièvement, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale puis décapitation. Le cerveau est rapidement extrait et placé dans du liquide céphalorachidien artificiel (ACSF) refroidit entre 1 et 4 °C, ce dernier est composé (en mM) : 119 NaCl, 2.5

KCL, 2.5 CaCl₂, 1.3 MgSO₄, 1 NaH₂PO₄, 26.2 NaHCO₃, 4 glucose, 7 sucrose). Le rhombencéphale et prosencéphale sont excisés et le cerveau est ensuite posé à plat sur sa partie rostrale. Avec l'aide de fine pincettes incurvées, le mésencéphale et la majorité de la substance blanche sont retirés. Le cerveau est ensuite posé à plat sur sa partie dorsale et les hippocampes retirés et tranchés au vibratome. Les tranches d'hippocampes sont par la suite maintenues à température ambiante, pendant au moins 1 heure avant les expérimentations, dans une chambre contenant de l'ACSF saturé avec 95 % O₂ et 5 % CO₂. Les coupes d'hippocampe sont ensuite transférées dans la chambre d'enregistrement immergée et perfusée avec de l'ACSF (2ml/min), montée sur un poste de microscopie « Scientifica SliceScope Pro 6000 microscope » équipé IR-DIC (infrared-differential interference).

Toutes les expériences ont été réalisées dans le *stratum radiatum*, une région de la zone CA1 de l'hippocampe (voir annexe 1). Les enregistrements de potentiels de champs excitateurs postsynaptiques (fEPSPs) ont été réalisés en présence de picrotoxine (100 µM), inhibiteur des récepteurs GABA, et avec des pipettes en verre (2-5 MΩ) remplies avec de NaCl 1M. Une entaille est faite entre les zones CA1 et CA3 pour prévenir la propagation d'activité épileptiforme (Figure 16A). Les réponses postsynaptiques ont été induites par stimulation des collatérales de Schaffer (0.033 Hz) dans le *stratum radiatum* du CA1 avec des pipettes remplies d'ACSF. Les relations stimulation/réponses des fEPSP ont été testées par augmentation graduelle de la force de stimulation (5 à 50 µA, 100 µs). L'intensité de stimulation pour les autres expérimentations d'électrophysiologie ex vivo a été choisie pour éliciter 50 % de la pente maximale. Les expériences de PPF (paired-pulse facilitation) consistent en l'administration de deux stimuli identiques avec des intervalles de temps croissant (50 à 250 ms). La facilitation produite sur la seconde réponse est exprimée pourcentage du premier fEPSP.

2.5. Enregistrements EEG et vidéo

Des transmetteurs sans fil (ETA-F10, Data Sciences International, Figure 13) ont été utilisés pour les enregistrements EEG couplés à la surveillance vidéo. Après anesthésie de l'animal (ketamine, 95 mg/kg ; xylazine, 10 mg/kg ; intrapéritonéal), une incision de 1 cm est réalisée sagittalement depuis la ligne médiane du crâne, et s'étend le long du cou pour créer une poche sous-cutanée sur le flanc de l'animal. Les électrodes d'enregistrements (coordonnées stéréotaxiques : -2 mm Antéropostérieur, +1.5 et -1.5 mm Latéralement) sont implantées au niveau de l'espace sous-dural grâce à la réalisation de petits trous percés à travers le crâne et maintenus en place avec du ciment dentaire. Les souris disposent d'un minimum de 7 jours de récupération avant les enregistrements.

Les signaux des EEG ont été acquis *via* des plateaux récepteurs placés sous chaque cage. Les données produites ont été collectées à une fréquence de 200 Hz (Figure 14) par le système DSI Dataquest A.R.T system version 4.33. Les grands principes de l'EEG ainsi que les terminologies et classifications rencontrées dans l'étude de l'épilepsie sont détaillés en Annexe 2 et 3.

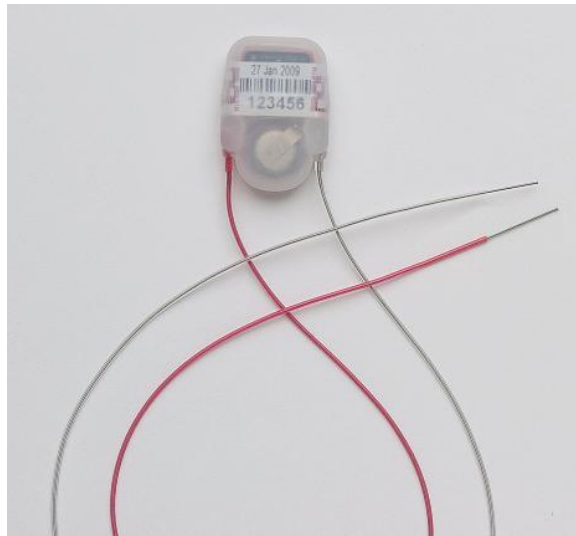


Figure 13 : émetteur bipolaire implantable permettant l'envoi de données sans fil. 1.1cc, 1.6gramme. (Avec la permission de Data Science International)

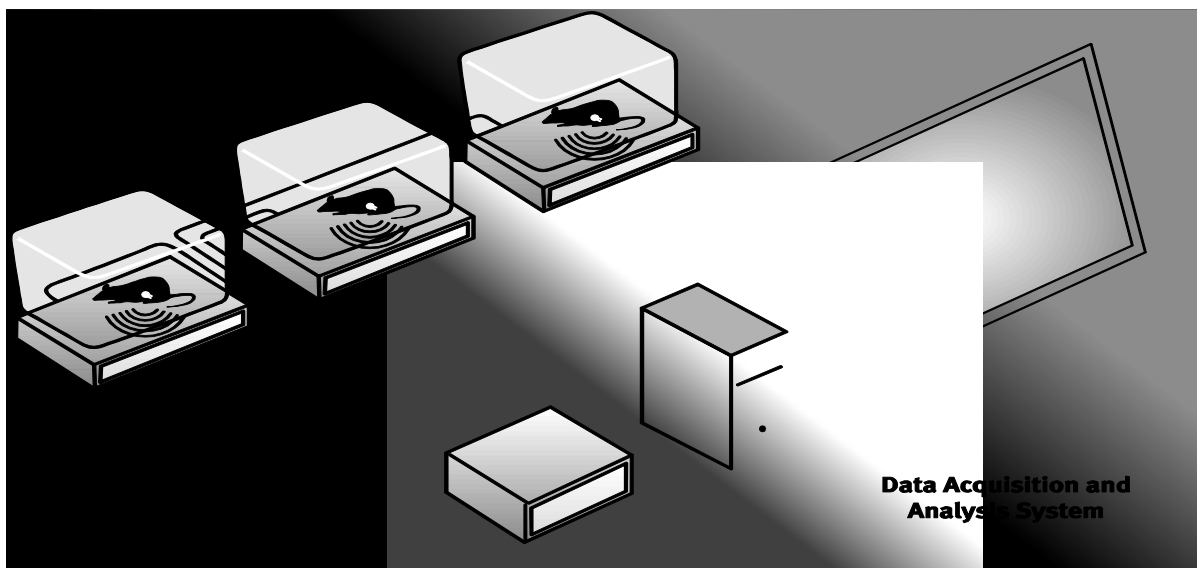


Figure 14 : Système d'acquisition et d'analyse des données pour expérimentation *in vivo*.

Ensemble comprenant plateaux récepteurs, système d'acquisition et d'analyse des données. (Avec la permission de Data Science International)

2.6. Modèle murin de convulsions induites par pentylènetétrazole

Des souris C57BL/6j âgées de neuf semaines ont été implantées avec les émetteurs sans fil ETA-F10 DSI pour l'acquisition de signaux EEG. Une semaine après implantations, elles ont été injectées en intrapéritonéale avec du pentylènetétrazole (PTZ) à une concentration de 50mg/kg, puis placées dans arène ouverte pour l'enregistrement vidéo et électroencéphalographique du *statut epilepticus* ainsi induit. Les propriétés protectives de chaque diète ont été évaluées après le nourrissage des souris avec un des trois régimes ; KD, CD ou SD (contrôle) pendant trois semaines avant l'injection de PTZ. L'évaluation des différents degrés de sévérité du *statut epilepticus*, le temps de latence avant l'émergence des crises ainsi que la fréquence des événements interictaux ont été quantifiés. L'échelle de Racine a été utilisée pour évaluer chaque niveau de sévérité de la manière suivante : 0, arrêt, aucune réponse ; 1, mouvement rythmique oro-faciaux ; 2, hochement de tête ; 3, myoclonies des pattes antérieure ; 4, se cabre avec des myoclonies bilatérales au niveau des pattes antérieures ; 5, se cabre avec perte d'équilibre ou saut.

2.7. Modèle kaïnate de l'épilepsie chronique

Pour la production de souris présentant une épilepsie chronique, l'injection intracérébrale de kaïnate a été utilisée. Une description plus détaillée des caractéristiques de ce modèle murin est fournie en Annexe 4.

Des souris mâles C57BL/6j âgées de six semaines ont été injectées unilatéralement avec du kaïnate (0.05 µl, 20 mM dans une solution saline à 0.9 %), à une vitesse de 0.5 µl/min dans la zone CA1 de l'hippocampe droit (à partir du bregma : -2 mm antéropostérieur, +1.5 mm latéral, -2 mm dorso-ventral) au moyen d'un appareil stéréotaxique et d'une canule (diamètre interne 0,29 mm) reliée à une pompe de précision. Les souris ont ensuite été laissées 3 semaines, temps requis pour présenter un phénotype chronique de l'épilepsie. Pour évaluer le potentiel thérapeutique de chaque diète, une fois la chronicité mise en place, les souris ont ensuite été nourries pendant 3 semaines avec KD, CD ou SD(contrôle) et enregistrées après ce traitement sur une période de 72 h dans leur propre cage via les émetteurs EEG ETA-F10 de DSI. Les crises sont définies comme séries de pic

(spike train) par le logiciel NeuroScore selon les paramètres suivant : durée minimum de 5 secondes à une fréquence égale ou supérieure à 1 Hz, amplitude minimum de 1,5 fois le rythme de fond (baseline) (Bergstrom *et al.*, 2013 ; Perera *et al.*, 2004). Les artefacts sont automatiquement détectés puis écartés par le logiciel *via* un seuil palier, et retiré manuellement.

2.8. Western blot

Les tissus corticaux entourant l'électrode sous-durale (Figure 19A) ont été récoltés et homogénéisés dans 2 % de SDS avec un mélange d'inhibiteurs de protéase, β -glycérophosphate (10mM), et orthovanadate (1mM). Des quantités égales de protéines sont séparées sur un gel PAGE à 10 %, puis transférées sur membranes de nitrocellulose. Les protéines sont détectées par immunomarquage avec le kit HRP-ECL de Perkin-Elmer. La GAPDH est utilisé comme témoin de charge. Les anticorps primaires employés sont : anticorps monoclonal de lapin contre la GAPDH (Sigma), anticorps polyclonaux de lapin contre la GFAP (Sigma). Anticorps secondaires d'âne anti-IgG de lapin couplé à la HRP (Amersham Biosciences).

2.9. Préparation des cerveaux pour marquage au DAPI

Six semaines après les injections intra-hippocampales au kaïnate, les souris sont anesthésiées, puis subissent des perfusions intracardiaques avec du PBS (0,1 M). Les cerveaux sont ensuite extraits et congelés dans de l'isopentane refroidi à -30 °C. Des coupes coronale (20 μ m) sont réalisées sur cryostat (Microm Cryo-Star HM 560), collectées sous forme de tranches, et fixé avec 4 % de paraformaldéhyde dans du PBS pendant 30 min à 4 °C. Les tranches sont ensuite préparées pour marquage DAPI, montées avec du fluoromount et mise à sécher avant d'être examinées par imagerie avec un microscope confocal (Leica TBCS SP2, SP5) sous les objectifs 10X et 60X.

2.10. Statistiques

Tous les résultats sont exprimés comme moyenne $\pm$ SEM et n représente le nombre d'expérimentation indépendante. La significativité statistique a été déterminé par les tests one-way et two-way ANOVA en utilisant les logiciels Statistica 6.1 (Statsoft Inc.) et Statview 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, USA).

3. Résultats

3.1. Élaboration d'une diète combinant différentes stratégies nutritionnelles pour parvenir à un régime à faible ratio [graisses : protéines + glucides]

Pour réussir à élaborer un régime présentant [graisses : protéines + glucides] ne déviant pas exagérément de celui de la diète standard (SD), nous avons des macronutriments associés à une réduction de l'excitation neuronale. Par conséquent, le contenu en acide gras de notre diète combiné a été choisi pour être enrichi à la fois en acide gras à chaîne moyenne et en acide gras polyinsaturé, ceci représente respectivement 32.2 % et 17.2 % du contenu énergétique fourni par les lipides du régime combiné (CD). Pour la partie glucide, 38.5 % de ses constituants sont apportés par une poudre végétale à index glycémique faible. Finalement, les protéines présentent un ratio élevé de BCAA/AAA, avec respectivement 20.6 % et 6.81 % de l'énergie protéique fournie par les BCAA et AAA (Figure 6A). La diète combinée contient moins de lipides et plus de glucides et protéines que la diète cétogène traditionnelle, se rapprochant ainsi des proportions en macronutriments de la diète standard (ratio SD 0,1:1 ; ratio CD 0,6 : 1 ; ratio KD 6,3 : 1 ; voir figure 6B pour les proportions d'apports caloriques des différents régimes).

Nous avons vérifié que les différentes diètes employées dans cette étude étaient consommées par les souris en quantité adéquate de sorte qu'elles n'altèrent pas leur masse corporelle. Des souris âgées de six semaines nourries *ad libitum* avec les régimes SD, CD ou KD n'ont pas montré de changement de leur masse corporelle, contrôlée tous les trois jours pendant les trois semaines de diète (souris SD : $+0.75 \pm 0.12$ g, n=6 ; souris CD : $+0.62 \pm 0.06$ g, n=5 ; souris KD : $+0.08 \pm 0.08$ g, n=6 ; $p > 0.05$; Figure 6C), indiquant ainsi, que les souris régulent leur prise alimentaire (i.e. diminution de la consommation avec les régimes plus riches) et ajustent leur métabolisme pour maintenir un poids constant.

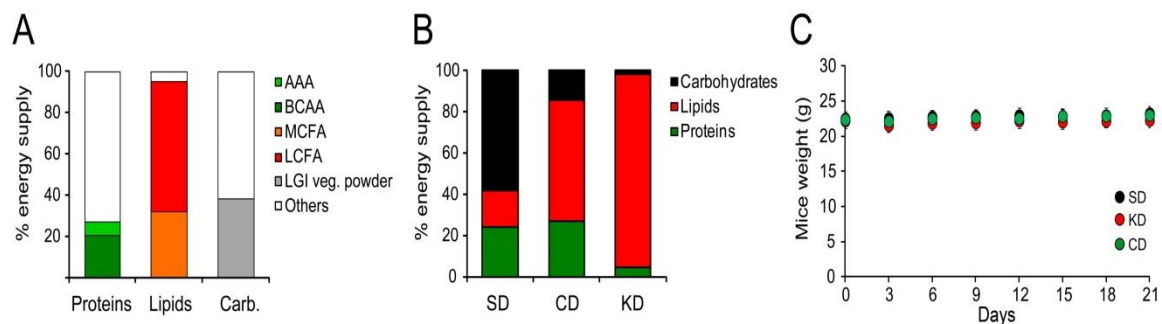


Figure 15. La nouvelle diète combinant différentes stratégies nutritionnelles permet de réduire le rapport [graisse] : [protéines + glucides]. A : Composition de l'apport calorifique total de la diète combinée. **B :** Répartition énergétique des macronutriments pour les régimes SD, CD et KD. **C :** Suivi du poids des souris dans les trois conditions nutritionnelles, avec mesure répétée tous les trois jours pendant trois semaines, aucun changement du poids de corps ne fut relevé pour les trois traitements.

3.2. Effet des régimes alimentaires sur la neurotransmission excitatrice

Pour tester les effets du régime CD sur les activités neuronales, nous avons d'abord étudié son impact sur la transmission synaptique excitatrice. Pour ce faire, nous avons testé les fonctions des synapses excitatrices de l'hippocampe allant de l'aire CA3 à CA1 en enregistrant les potentiels des champs extracellulaires évoqués provenant de souris nourries trois semaines avec le régime SD, CD ou KD. Étonnamment, les relations stimulations/réponses révèlent que les régimes CD et KD engendrent tous deux une réduction de l'efficacité synaptique excitatrice basale, en regard de la diète contrôle SD (Figure 16A; D: n=14; CD: n=7; KD: n=6; $p < 0.001$ pour ces deux diètes).

Pour déterminer si de telles régulations négatives pouvaient être causées par la présence de grandes concentrations de corps cétoniques, des échantillons de sang furent prélevés sur des souris nourries avec les différentes diètes, et testés pour les corps cétoniques β -hydroxybutyrate (β HB) et acétoacétate (ACA), ceux de la glycolyse ont également été utilisés pour évaluer la concentration de glucose, de lactate et de pyruvate (Figure 16B). Comme attendu, les souris nourries au régime KD (n=10) sont entrées en cétose, avec des concentrations sanguines de corps cétoniques, β HB et ACA, fortement élevées en regard de celles nourries avec le régime SD (n=16) ($p < 0.001$), tandis que les autres marqueurs métaboliques de la glycolyse, tels que le glucose ($p < 0.01$), le lactate et le pyruvate ($p < 0.05$), ont significativement diminués (Figure 16B). En contraste de ceci, le sang des souris nourries avec le régime CD (n=6) montre de grandes concentrations en glucose et pyruvate, et des niveaux très bas de β HB et ACA, similairement au contrôle SD (tous $p > 0.05$). De façon intéressante, une baisse significative du niveau de lactate est observée ($p < 0.05$). Ces résultats suggèrent que la diète CD, contrairement au régime KD, ne favorise pas la cétose, montrant ainsi, que la diminution de l'efficacité de transmission synaptique, ne dépend pas de la présence des corps cétoniques.

Nous avons ensuite évalué si de telles réductions de la neurotransmission pouvaient être attribuables à un changement de la concentration en glutamate dans la fente synaptique, comme proposé avec la diète KD (Juge *et al.*, 2010), en utilisant l' γ -D-glutamylglycine (γ -DGG), un antagoniste compétitif à faible affinité des récepteurs AMPA, qui a concentration non saturante (0.5 mM) permet de refléter la

concentration synaptique du glutamate. L'inhibition par le γ -DGG des fEPSP induits par stimulations évoquées, est significativement plus forte dans les régimes CD et KD en comparaison avec la diète contrôle (Figure 16C ; SD : -40.8 ± 5.0 %, $n=9$; CD : -51.9 ± 6.6 %, $n=7$, $p<0.05$; KD : -57.4 ± 3.9 %, $n=6$, $p<0.001$), et indique ainsi que les animaux nourris avec la diète KD ou CD, comportent dans la zone CA1 de l'hippocampe, de faibles concentrations de glutamate à la synapse.

Finalement, pour tester si la diminution de glutamate dans la fente synaptique peut être due à une baisse de la libération des neurotransmetteurs au niveau présynaptique, nous avons évalué la PPF, une forme de plasticité à court terme qui connut pour refléter le changement de probabilité de libération vésiculaire au niveau pré-synaptique (Dallérac *et al.*, 2011 ; Zucker, 1973). Les profils de PPF pour le régime KD et CD sont significativement différents de la diète contrôle (2-way ANOVA, $p<0.05$), et présentent une plus grande facilitation dans les intervalles de stimulations les plus courts (Figure 16D ; SD : $+33.33 \pm 11.35$ %, $n=5$; CD : $+105.62 \pm 25.56$ %, $n=7$, $p<0.001$; KD : $+75.15 \pm 15.14$ %, $n=6$, $p<0.05$), traduisant une diminution de la probabilité de libération vésiculaire à la synapse.

Dans l'ensemble, ces données indiquent des effets similaires pour les régimes KD et CD. La réduction du glutamate relâché au niveau des synapses excitatrices, suggère que la diète combinée non cétogène peut être employée comme une stratégie de traitement alternative contre les crises d'épilepsie.

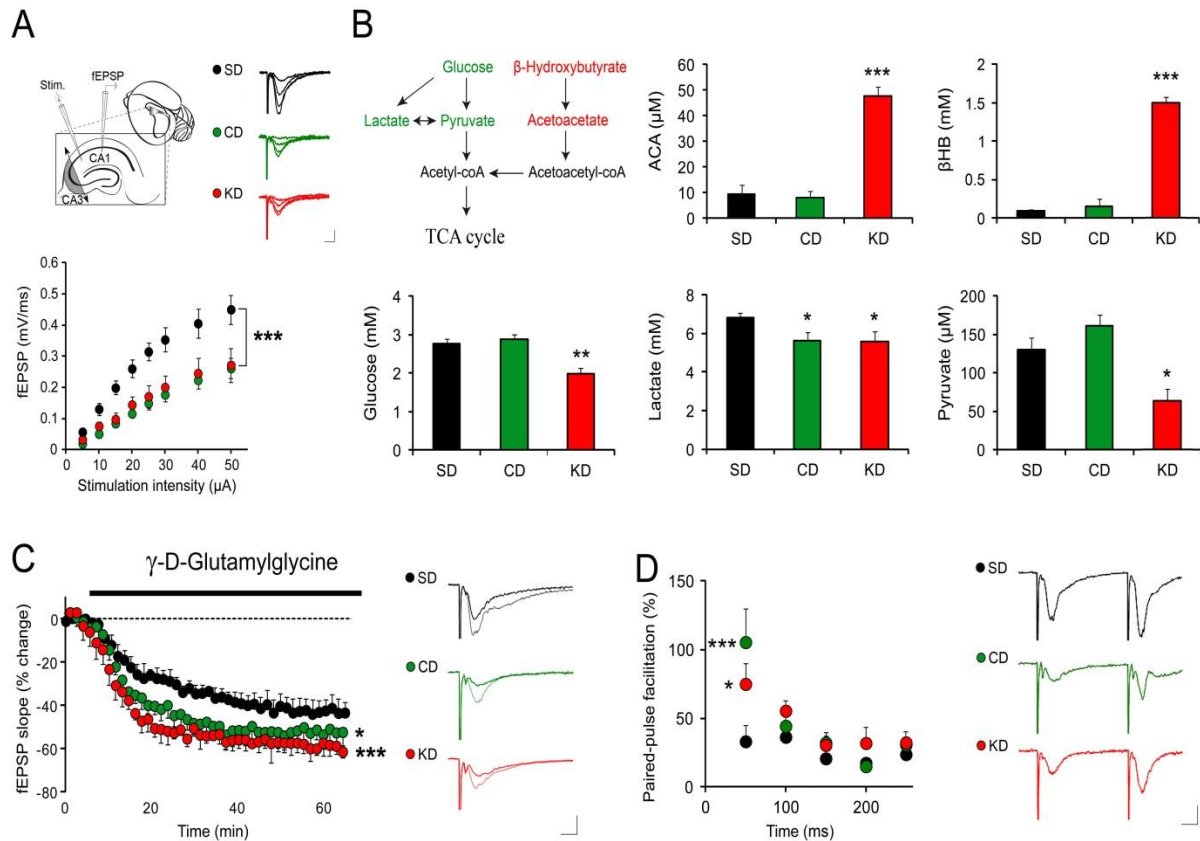


Figure 16. Le traitement par la diète combinée réduit la transmission synaptique excitatrice. **A** : Tranches d'hippocampe préparées depuis les souris nourries avec les régimes KD ou CD affichent une réduction de l'activité basale de la transmission synaptique en regard des animaux contrôles nourris avec la diète SD (SD, n=14 ; CD, n=7 ; KD, n=6 ; $p < 0.001$). Barre d'échelle : 10 ms, 0.5mV. **B** : L'analyse de la concentration sanguine des corps cétoniques a montré une augmentation significative pour le β -hydroxybutyrate (β HB ; $p < 0.001$) et l'acétoacetate (ACA ; $p < 0.001$) seulement chez le groupe KD (n=10). Les marqueurs de la glycolyse (glucose, $p < 0.01$; lactate, $p < 0.05$; pyruvate, $p < 0.05$) se sont aussi révélés significativement réduits pour le régime KD, indiquant que seulement pour cette diète, il est retrouvé une cétonémie élevée. Le seul changement observé pour le groupe CD fut une réduction significative du lactate ($p < 0.05$). **C** : L'antagoniste compétitif de faible affinité γ -d-glutamylglycine (γ -DGG), à une concentration non-saturante (0.5mM), possède un pouvoir inhibiteur qui dépend de la concentration en glutamate, et fait décroître la neurotransmission dans une plus grande mesure chez les souris CD et KD, en comparaison du contrôle SD (SD, n=9 ; KD, n=6, $p < 0.001$; CD, n=7, $p < 0.05$), signalant ainsi la faible concentration synaptique de glutamate chez les groupes CD et KD. Barre d'échelle : 10 ms, 0.5mV). **D** : Les traitements par les diètes KD et CD ont aussi résulté en augmentation de la facilitation de pulse-pairé (SD, n=5 ; KD, n=6, $p < 0.05$; CD, n=7, $p < 0.001$), lesquels indiquent une diminution de la probabilité de relargage vésiculaire. Ces observations corroborent ainsi la réduction de la transmission synaptique observée en A, et la diminution des niveaux de glutamate vue en C. Exemple de tracés montrant la facilitation à un intervalle inter-stimulation de 50 ms. Barre d'échelle : 10 ms, 0.5 mV. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.3. Test de susceptibilité aux crises induites de manière aiguës

Pour étudier si le régime CD pourrait apporter une protection contre les crises, nous avons induit de manière aiguë, des événements paroxystiques pouvant être accompagnés de convulsions, par l'injection intrapéritonéale d'une drogue proconvulsivante le PTZ, un antagoniste des récepteurs GABA_A (Figure 17A ; 50mg/ml). La vidéo du comportement de l'animal ainsi que le tracé électroencéphalographique associé sont enregistrés simultanément. Aucune souris n'a montré de crise spontanée ou de signe précurseur d'activités anormales, tel que l'apparition de pointes et/ou ondes avant l'injection de PTZ. La latence avant ictus engendré par l'injection de PTZ est de 97.14 ± 13.10 s pour le groupe de souris nourri au régime standard SD (Figure 17B ; n=7). Remarquablement, le temps de latence observé pour les autres régimes a quasiment doublé, avec pour la CD 191.20 ± 11.08 s (n=8, $p < 0.001$) et le groupe nourri avec la KD 180.80 ± 17.00 s (n=5, $p < 0.01$), indiquant ainsi que pour ces régimes les souris étaient moins enclin à déclencher des événements paroxystiques. En accord avec ces résultats, la fréquence des événements interictaux est réduite d'environ 30 % dans les groupes CD et KD, comparée aux contrôles (SD : 0.22 ± 0.03 Hz ; CD : 0.14 ± 0.01 Hz, $p < 0.001$; KD : 0.14 ± 0.02 Hz, $p < 0.01$) (Figure 17C). Cependant, la sévérité associée aux convulsions comportementales est comparable entre ces groupes, ou la plupart des attaques paroxystiques sont $\geq$ au grade 4 dans les groupes SD (100 %), CD (~90 %) et KD (100 %). Dans l'ensemble ces résultats indiquent que les régimes CD et KD, diminuent de façon comparable la propension aux événements paroxysmaux.

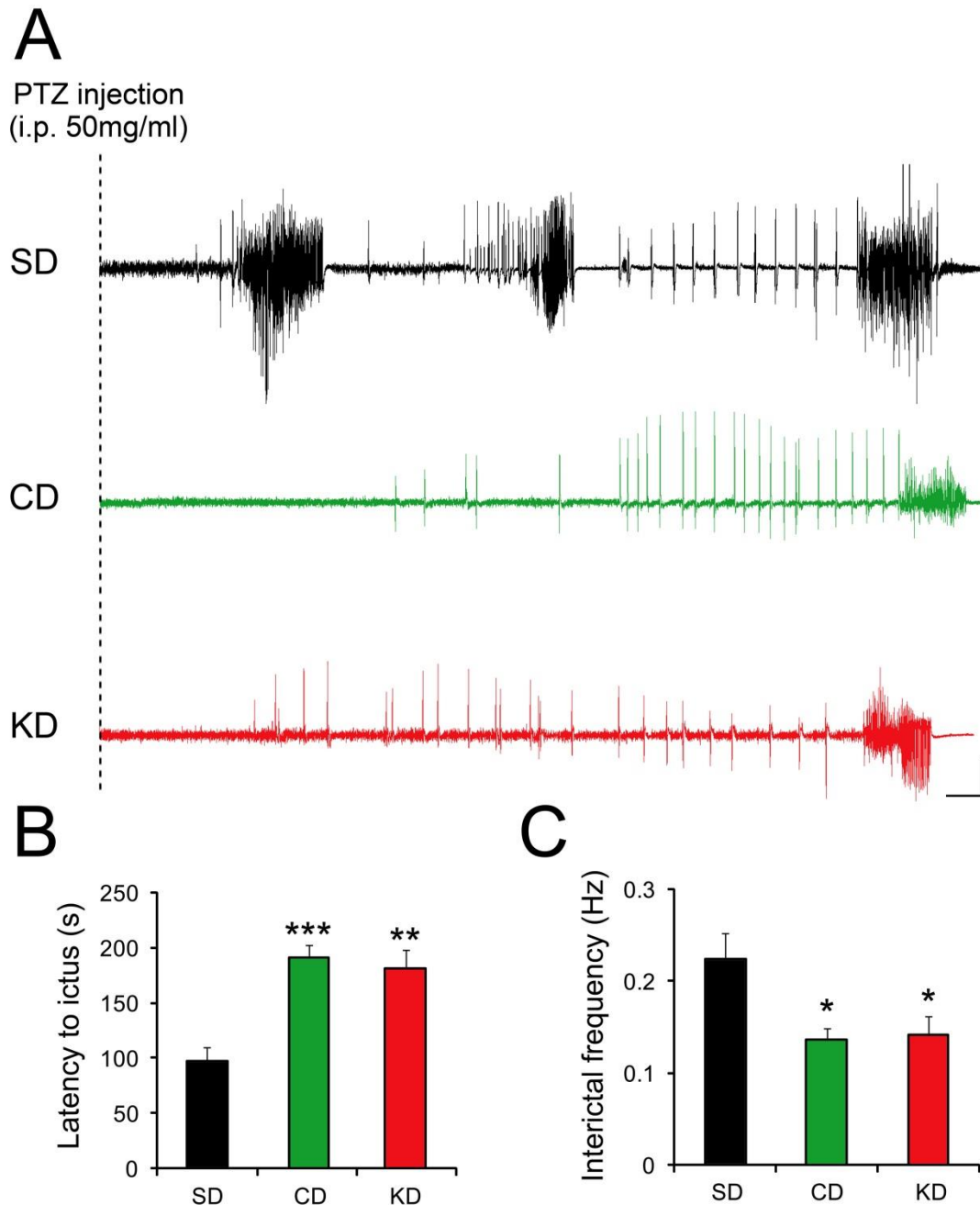


Figure 17. Le traitement par la diète CD diminue la susceptibilité de déclencher des crises. A-B : Une injection de pentylènetétrazole (PTZ ; 50mg/ml) intrapéritonéale entraîne rapidement l'apparition d'événements paroxystiques et un *statut epilepticus* chez les souris contrôle SD. Pour les souris recevant le traitement KD ou CD, l'évènement ictal, met de manière significative, plus de temps pour se déclencher (SD, n=7 ; KD, n=5, $p<0.01$; CD, n=8, $p<0.001$), indiquant un degré de protection semblable pour ces deux diètes. **A-C :** Corroborant ces résultats, la fréquence des événements interictaux fut trouvée significativement réduite pour les diètes CD et KD, en comparaison des souris contrôles SD (tous $p<0.05$). Barre d'échelle : 10 s, 500 μ V. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

3.4. Test de protection contre les crises chroniques

L'induction du *status epilepticus* avec le PTZ est un test aigu *in vivo* permettant d'évaluer la sensibilité des souris aux agents pro-épileptique. Dans notre étude, il permet l'évaluation des propriétés protectives de ces diètes. Cependant, ce type de test ne fournit pas d'informations sur les effets des régimes dans un contexte épileptique établi, condition plus proche de la pathologie humaine. Un modèle classique de l'épilepsie chronique chez la souris est le modèle KA, connu pour mimer l'épilepsie du lobe temporal. Il est obtenu par injection unilatérale de KA dans l'hippocampe (Figure 18A). S'ensuit une période latente d'à peu près deux semaines suivie de l'apparition de crises focales et récurrentes, espacées par des activités interictales de type pointes et/ou ondes, qui se manifesteront toute la vie de l'animal (Riban *et al.*, 2002).

Pour tester si notre stratégie combinée à la capacité d'apaiser un tissu déjà épileptique, nous avons injecté du kaïnate (20 mM, 0.05 μ l) dans la région CA1 de l'hippocampe chez des souris mâles C57BL/6j âgées de six semaines (Figure 18A) et, après une attente de trois semaines, temps requis pour la mise en place du phénotype épileptique chronique, les souris ont été nourries pendant trois autres semaines avec les régimes SD, CD ou KD (Figure 18B). De façon marquante, tandis que le groupe contrôle SD (n=10) présente une soixantaine d'évènements épileptiques par jour détectés *via* l'EEG, les groupes CD (n=13) et KD (n=8) montrent une diminution drastique d'environ 90 % de la fréquence d'apparition des crises (Figure 18C-D). La durée des crises détectées n'est cependant pas changée (Figure 18D-E ; SD : 9.82 ± 0.45 s ; CD : 11.25 ± 1.08 s ; KD : 10.43 ± 0.51 s ; $p > 0.05$).

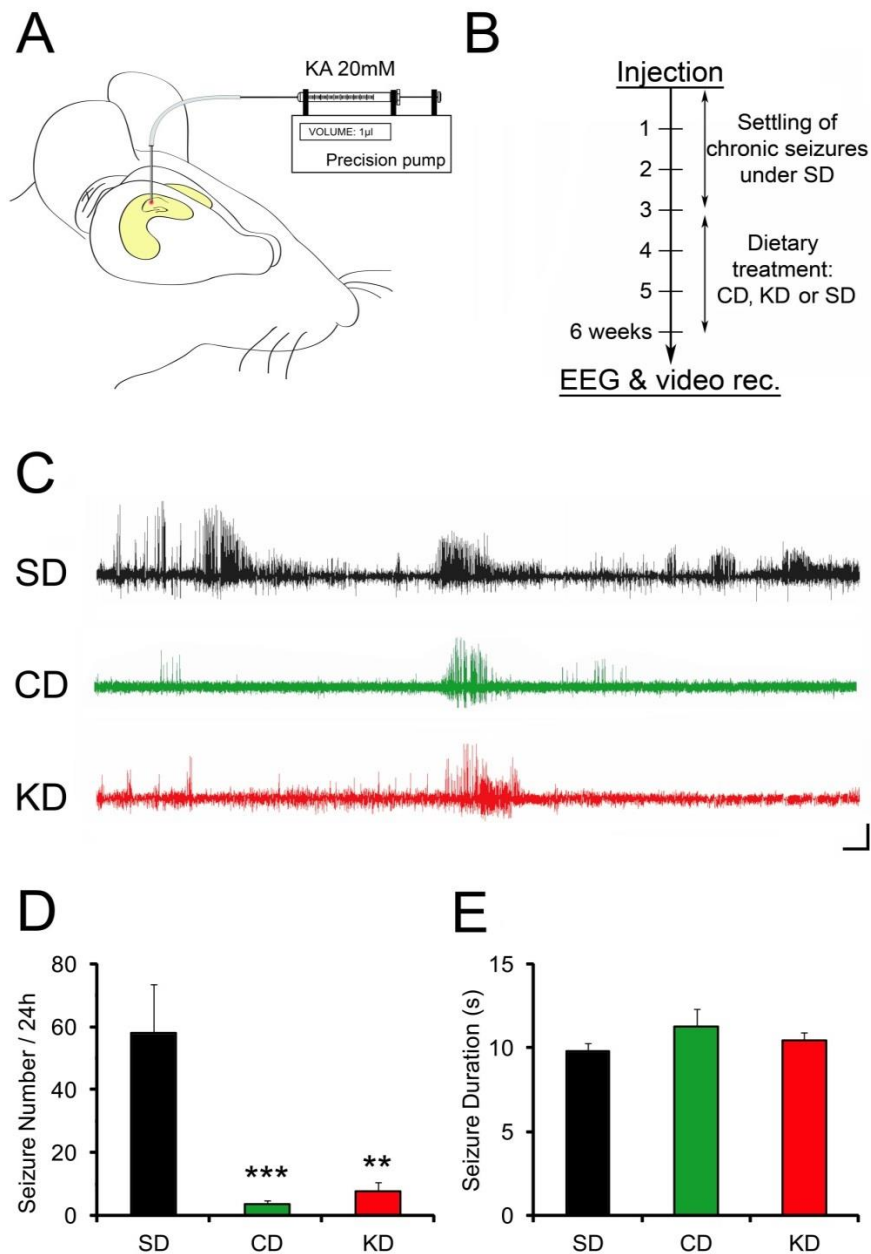


Figure 18. Le traitement CD réduit l'apparition de crises en phase chronique.

A : Le modèle de souris KA mimant l'épilepsie chronique, consiste en une injection unilatérale intra-hippocampique de kaïnate (20 mM, 0.05 µl), au moyen d'une canule connectée à une pompe de précision. **B** : Les souris sont laissées sous régime standard (SD) pendant trois semaines, temps requis pour développer des crises apparaissant de manière chronique, et sont ensuite nourries avec les différents régimes KD ou CD, les contrôles sont laissés avec la diète SD. **C-D** : Les crises détectées via l'EEG sont drastiquement réduites pour les souris traitées avec le KD (n=8, $p<0.01$) et le CD (n=13, $p<0.001$), en comparaison du groupe contrôle (n=13). **C, E** : La durée des événements détectés ont montré des résultats similaires entre les différents groupes SD, KD et CD. Barre d'échelle : 10 min, 200 µV. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Nous avons également examiné un corrélat moléculaire de l'épilepsie chronique, par l'évaluation de l'expression de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) dans le tissu épileptique cortical (Figure 19A). En effet, les crises répétitives déclenchent des processus inflammatoires, lesquels induisent une surexpression de GFAP, conséquence de la réactivité gliale et la gliose. En accord avec la réduction marquée du nombre de crises détectées, les western blots des groupes CD et KD montrent une plus faible immunoréactivité pour GFAP, en regard du groupe SD contrôle (Figure 19B-C ; n=4 par groupe ; $p<0.05$).

Finalement, les corrélats cytologiques des crises récurrentes ont été testé par évaluation de la dispersion des cellules granulaires du gyrus denté de l'hippocampe et de la mort cellulaire des zones CA1 et CA3, ces deux conséquences typique de l'épilepsie du lobe temporal en phase chronique (Figure 19D). Les souris du groupe SD présentent classiquement une large dispersion de la couche des cellules granulaires, ceci en comparaison avec les animaux contrôles qui n'ont pas subi d'injection au kaïnate. De façon remarquable, les souris CD n'ont pas montré ce phénotype et une dispersion significativement réduite est observée chez le groupe KD (Figure 19E-F). La perte cellulaire dans les aires CA1 et CA3 de l'hippocampe est également réduite dans ces deux groupes (Figure 19G-J).

Dans leur ensemble, ces résultats indiquent que la stratégie de la diète combinée permet de diminuer l'activité excitatrice, et a pour conséquence une réduction de la fréquence d'apparition d'évènements paroxystiques, apaisant ainsi les tissus déjà épileptiques..

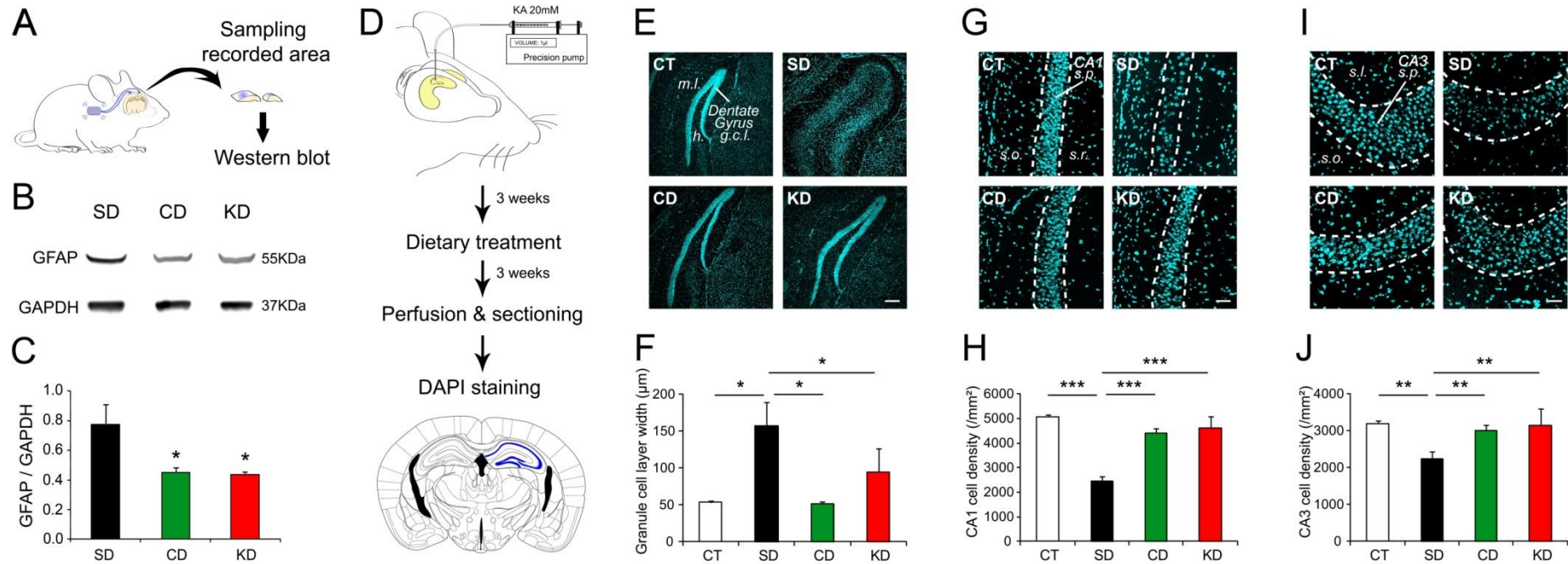


Figure 19. Le traitement CD permet de protéger contre les corrélats moléculaires et histopathologiques exprimés en phase chronique, habituellement retrouvés chez la souris kainate. **A** : Les tissus corticaux enregistrés des souris KA sont prélevés pour immunodosage. **B-C** : L'expression de la GFAP fut significativement réduite pour les souris traitées avec la diète KD ou CD (n=4 par groupe, KD et CD p<0.05). **D** : Les souris KA sont préparées pour les analyses histologiques des aires hippocampiques CA1, CA3 et gyrus denté (DG). **E-F** : Pour les groupes CD et KD (CD, n=5 ; KD, n=5), les souris ont montré une protection contre la dispersion de la couche des cellules granulaires du gyrus denté (g.c.l) en comparaison des souris SD (SD, n=6) (p<0.05), et ne sont pas significativement différentes des souris ne recevant pas de kainate (CT, n=3). **G-J** : Les souris nourries aux régimes CD et KD ont aussi une protection contre la mort cellulaire dans le CA1 et le CA3 en regard des animaux du régime SD. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. h. : hilus, m.l. : couche moléculaire, s.l. : stratum lucidum, s.o. : stratum oriens, s.p. : stratum pyramidale, s.r. : stratum radiatum.

4. Discussion

La présente étude a pour but de déterminer si la prise alimentaire spécifique de certains nutriments peut induire une diminution efficace de la neurotransmission excitatrice et en conséquence produire une protection contre les crises. A notre connaissance, ceci est la première étude évaluant les effets d'une combinaison de stratégies antiépileptiques ayant pour but d'affaiblir la transmission excitatrice et l'apparition de crises. L'évaluation des fonctions synaptiques hippocampiques des collatérales de Schaffer de CA3 à CA1, indique que les souris nourries avec la diète montrent une baisse significative de la neurotransmission excitatrice, et que celle-ci est due à une réduction de la libération de glutamate. En accord avec ceci, les souris du groupe CD sont moins susceptibles aux crises induites par le PTZ, et largement protégées contre les événements épileptiques chroniques induits par le kainate, modèle connu pour refléter l'épilepsie du lobe temporal.

De façon intéressante, contrairement aux souris nourries avec la diète KD, la cétose n'est pas retrouvée chez les animaux CD alors que les changements de neurotransmission et de susceptibilités aux déclenchements de crises sont similaires au groupe KD. Ces résultats soutiennent l'hypothèse avançant que les corps cétoniques ne sont pas impliqués dans la diminution de l'excitation classiquement associée avec le régime KD. Plusieurs études ont en effet rapporté le manque de corrélation entre le taux de cétose et la protection contre les crises (Van Delft *et al.*, 2010 ; Fraser *et al.*, 2003 ; Kang *et al.*, 2007 ; Kossoff *et al.*, 2006 ; Muzykewicz *et al.*, 2009 ; Neal *et al.*, 2009 ; Ross *et al.*, 1985). Ces recherches corroborent les études effectuées *in vitro* montrant l'inexistence d'un effet inhérent du β HB ou de ACA sur la transmission synaptique (Donevan *et al.*, 2003 ; Thio *et al.*, 2000), bien qu'une application brève de ces composants ne peut probablement pas refléter leurs effets bénéfiques, qui nécessitent pour apparaître des périodes prolongées à l'instar des traitements longues durées. Plus précisément, la plupart des études examinant les effets intrinsèques des corps cétoniques par application directe dans de l'ACSF contenant du glucose n'ont trouvé aucun effet les fonctions synaptiques (Donevan *et al.*, 2003 ; Thio *et al.*, 2000) tandis que le remplacement du glucose extracellulaire par du β HB ou de l'ACA réduit la neurotransmission (Freche *et al.*, 2012). Par

conséquent, une question récurrente, mais à ce jour irrésolue est de savoir si la réduction de l'excitation est attribuable au métabolisme lipidique ou, plutôt, à la mise en dormance du métabolisme glucidique. Cette dernière possibilité est étayée par une étude récente montrant que le blocage de l'enzyme de la glycolyse LDH suffit à hyperpolariser les neurones et permettre une protection contre les crises. Nos résultats sont en accord avec ceci, puisque les animaux nourris avec le régime CD n'ont montré aucune augmentation de la concentration de corps cétoniques dans le sang alors qu'une diminution de la neurotransmission identique au groupe KD a été observée. La réduction du lactate constatée chez les souris des groupes CD et KD plaident en faveur de cette dernière interprétation qui peut être la résultante directe de la baisse de l'activité de conversion du glucose et pyruvate en lactate par la LDH. Ceci peut être une conséquence possible de la diète à faible index glycémique (Lacombe *et al.*, 2006 ; Stannard *et al.*, 2000), enrichie en BCAA (Coombes et McNaughton, 2000 ; Koba *et al.*, 2007), comme des concentrations importantes de triglycérides à chaînes moyennes (Nagasaka *et al.*, 2007 ; Nosaka *et al.*, 2009 ; Van Zyl *et al.*, 1996) et acides gras polyinsaturés (Andrade-Vieira *et al.*, 2013). De façon importante, bien qu'il ait été précédemment proposé que la concentration synaptique du glutamate soit réduite avec le régime cétogène (Juge *et al.*, 2010), nous découvrons ici que cette réduction est due, au moins en partie, à une baisse de la probabilité de relargage vésiculaire. Dans la mesure où les diètes cétogène KD et non-cétogène CD induisent exactement les mêmes changements de neurotransmission, et que celles-ci sont conformes avec l'hyperpolarisation neuronale montrée par Sada *et al.* (2015), il est en effet probable que les stratégies nutritionnelles employées dans notre diète combinée concourent à abaisser la voie métabolique du LDH, un des composants de la navette lactate astrocyte-neurone. Il est naturellement probable que d'autres mécanismes puissent agir en parallèle pour freiner l'excitation neuronale, tel que par exemple les niveaux réduits de glutamate dans le cerveau qui pourrait résulter du ratio élevé de BCAA/AAA (Evangeliou *et al.*, 2009 ; Fernstrom, 2005 ; Jirapinyo *et al.*, 2004), ou l'hyperpolarisation neuronale qui pourrait être induit par des acides gras polyinsaturés qui moduleraient des canaux ionique voltage dépendants (Tigerholm *et al.*, 2012), ou par l'augmentation de l'activation des récepteurs à l'adénosine par un traitement enrichi en triglycérides à chaînes moyennes, lesquels réduisent la probabilité de libération de neurotransmetteurs (Socala *et al.*, 2015).

Bien que la diète cétogène classique est moins délétère en termes de santé globale à ce que l'on peut s'imaginer en regard de son contenu extrêmement riche en graisse, de nombreux effets indésirables ont été reportés. En effet, celle-ci peut inclure des défauts de croissances (chez les enfants), des niveaux de lipides trop importants, des troubles de la fonction cardiaque, lithiase rénale, problèmes hématologiques, immunologiques, atteinte métabolique (acidose, hyperuricémie), ainsi que des problèmes de diarrhées, nausées et vomissements (Huffman et Kossoff, 2006 ; Vining, 2008). La complication la plus commune du régime KD est l'hyperlipidémie, avec une augmentation de la concentration de triglycérides, apolipoprotéines, very low and low lipoproteins (VLDL et LDL) (Zamani *et al.*, 2016). Ces effets secondaires sont cependant réversibles lors de l'interruption de la diète KD. Dans cette optique, la stratégie nutritionnelle de la diète combinée que nous proposons ici, serait probablement plus bénéfique, en regard de sa composition plus faible en graisse, et de son enrichissement en nutriments connus pour amoindrir de tels problèmes. En effet, les acides gras polyinsaturés fournis par l'huile de colza ont montré des bienfaits chez les enfants souffrant d'hypercholestérolémie (Negele *et al.*, 2015) et les acides gras polyinsaturés issus de l'huile d'olive ont aussi démontré un effet contre la dyslipidémie (Güzel *et al.*, 2016). Les acides gras à chaînes moyennes possèdent également un pouvoir réducteur sur la concentration de cholestérol, triglycérides et lipoprotéines (Kritchevsky et Tepper, 1965 ; Nagasaka *et al.*, 2007 ; Shirai *et al.*, 1992). De façon intéressante, plusieurs études ont aussi suggéré que la prise de glucides à bas index glycémique avait la capacité de réduire la teneur en lipide dans le sang (Fleming et Godwin, 2013 ; Juanola-Falgarona *et al.*, 2015 ; Li *et al.*, 2015 ; Min *et al.*, 2016). Le retard de croissance est également un effet préjudiciable qui reste souvent observé chez les enfants sous le régime KD. L'utilisation de triglycérides à chaînes moyennes avec la diète KD semble avoir permis d'augmenter la taille chez les enfants épileptiques (Liu *et al.*, 2003). Il est donc probable qu'une approche diététique plus équilibrée, incluant par exemple des acides gras à chaînes moyennes tel qu'utilisé dans notre étude, permette d'éviter des retards de croissance.

Dans la mesure où la non-palatabilité de la diète cétogène rend son adhérence très difficile, le KD est rarement utilisé pour traiter les adultes (Klein *et al.*, 2010, Mosek *et al.*, 2009 ; Sirven *et al.*, 1999). Pour contourner ce problème, Kossoff *et al.* ont

développé un régime protéique moins restrictif nommé « modified Atkins diet » (MAD). Cette stratégie s'est révélée efficace puisque ~50 % des patients montrent une réduction de la fréquence des crises d'au moins 50 % (Sirven et al 1999).. Cependant, bien que la diète soit bien tolérée par les patients, l'hyperlipidémie reste encore communément observée (Cervenka et al., 2016 ; Kossoff et al., 2008). La stratégie nutritionnelle proposée ici devrait être aussi plus palatable que la diète cétogène traditionnelle et possiblement plus que le régime MAD, car la diète CD est enrichie en carbohydrates (~15 % contre ~10 % pour le MAD) tout en comportant des proportions similaires en protéines et graisses. Étant donné que l'impact bénéfique des acides gras polyinsaturés et des produits à faible index glycémique (Fleming et Godwin, 2013 ; Livesey et al., 2008) sur les paramètres de santé, comme la concentration sanguine de lipide, et la gérabilité des troubles intestinaux induits par les triglycérides à chaînes moyennes (Liu et Wang, 2012), il est raisonnable de présumer que cette nouvelle approche de diète combinée peut être bien tolérée par les patients.

D'autres aspects positifs de cette approche diététique émergent de récents travaux montrant que les triglycérides à chaînes moyennes et les acides gras polyinsaturés possèdent un impact bénéfique sur la cognition, principalement en ralentissant le déclin cognitif en condition pathologique ou de vieillissement normal (Bazinet et al., 2014 ; Herbert et Buckley, 2013 ; Manteca, 2011 ; Reger et al., 2004 ; Sharma et al., 2014). En regard des états épileptiques souvent délétères pour les fonctions cognitives, en outre la protection contre les crises, le régime CD pourrait aussi être appréciable pour ces effets procognitifs. Finalement toujours dans cette même optique, il a été montré que les BCAA aident à la récupération après un traumatisme cérébral (Aquilani et al., 2005 ; Cole et al., 2010 ; Lim et al., 2013), et peuvent par conséquent montrer des propriétés réparatrices sur des lésions induites par les lésions.

En résumé, en comparant les effets de la KD avec la combinaison de différentes stratégies antiépileptiques sur la transmission excitatrice basale ainsi que sur leurs conséquences en termes de susceptibilités aux crises chroniques ou induites de manières aiguës, la présente étude fournit la preuve de concept que l'association de nutriments spécifiques dans un même régime non-cétogène confère une protection

robuste contre les crises. Une telle diète est plus équilibrée (faible rapport [graisses] / [glucides + protéines] que le régime classique KD ou MAD, et contient des nutriments associés à plusieurs effets bénéfiques sur la santé générale, incluant fonctions cognitives et le système cardiovasculaire. La réalisation d'essais cliniques avec cette nouvelle combinaison de plusieurs approches nutritionnelles serait maintenant d'un grand intérêt.

5. Références bibliographiques

- Alle H, Roth A, Geiger JR (2009) Energy-efficient action potentials in hippocampal mossy fibers. *Science*. 2009 Sep 11;325(5946):1405-8. doi:10.1126/science.1174331.
- Andrade-Vieira R, Han JH, Marignani PA (2013) Omega-3 polyunsaturated fatty acid promotes the inhibition of glycolytic enzymes and mTOR signaling by regulating the tumor suppressor LKB1. *Cancer Biol Ther* 14:1050–8. doi: 10.4161/cbt.26206.
- Aquilani R, Iadarola P, Contardi A, Boselli M, Verri M, Pastoris O, Boschi F, Arcidiaco P, Viglio S (2005) Branched-Chain Amino Acids Enhance the Cognitive Recovery of Patients With Severe Traumatic Brain Injury. *Arch Phys Med Rehabil* 86:1729–1735. doi: 10.1016/j.apmr.2005.03.022.
- Arzimanoglou, A., Ben-Menachem, E., Cramer, J. et al. *Epileptic Disord* (2010) 12: 3. doi:10.1684/epd.2010.0303.
- Azarias G, Perreten H, Lengacher S, Poburko D, Demaurex N, Magistretti PJ, Chatton JY (2011) Glutamate transport decreases mitochondrial pH and modulates oxidative metabolism in astrocytes. *J Neurosci*. 2011 Mar 9;31(10):3550-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4378-10.2011.
- Badman MK, Koester A, Flier JS, Kharitonov A, Maratos-Flier E (2009) Fibroblast growth factor 21-deficient mice demonstrate impaired adaptation to ketosis. *Endocrinology*. 2009 Nov;150(11):4931-40. doi: 10.1210/en.2009-0532.
- Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, Koukos G, Flier JS, Maratos-Flier E (2007) Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab*. 2007 Jun;5(6):426-37.
- Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS (2006) The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem*. 2006 Aug;98(3):641-53. Review.
- Bauernfeind AL, Barks SK, Duka T, Grossman LI, Hof PR, Sherwood CC (2014) Aerobic glycolysis in the primate brain: reconsidering the implications for growth and maintenance. *Brain Struct Funct*. 2014 Jul;219(4):1149-67. doi: 10.1007/s00429-013-0662-z. Review.
- Bazinet RP, Layé S (2014) Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat Rev Neurosci* 15:771–785. doi: 10.1038/nrn3820

- Bélanger M, Allaman I, Magistretti PJ (2011a) Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab.* 2011 Dec 7;14(6):724-38. doi: 10.1016/j.cmet.2011.08.016. Review.
- Bélanger M, Yang J, Petit JM, Laroche T, Magistretti PJ, Allaman I (2001b) Role of the glyoxalase system in astrocyte-mediated neuroprotection. *J Neurosci.* 2011 Dec 14;31(50):18338-52. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1249-11.2011.
- Ben-Ari Y (2012) Kainate and Temporal Lobe Epilepsies: 3 decades of progress. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, editors. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* [Internet]. 4 th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US).
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2012) *Biochemistry*. 5 th edition. New York: W H Freeman; 2002
- Berg, A. T., Berkovic, S. F., Brodie, M. J., Buchhalter, J., Cross, J. H., Van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T. A., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D., Plouin, P. and Scheffer, I. E. (2010) Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia*, 51: 676–685. doi: 10.1111/j.1528-1167.2010.02522.x.
- Bergstrom RA, Choi JH, Manduca A, Shin H-S, Worrell GA, Howe CL (2013) Automated identification of multiple seizure-related and interictal epileptiform event types in the EEG of mice. *Sci Rep* 3:1483. doi: 10.1038/srep01483.
- Bittar PG, Charnay Y, Pellerin L, Bouras C, Magistretti PJ (1996) Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996 Nov;16(6):1079-89.
- Bittner CX, Valdebenito R, Ruminot I, Loaiza A, Larenas V, Sotelo-Hitschfeld T, Moldenhauer H, San Martín A, Gutiérrez R, Zambrano M, Barros LF (2011) Fast and reversible stimulation of astrocytic glycolysis by K⁺ and a delayed and persistent effect of glutamate. *J Neurosci.* 2011 Mar 23;31(12):4709-13. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5311-10.2011.
- Blau N, Duran M, Gibson KM (2008) *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics*. doi: 10.1007/978-3-540-76698-8.
- Bolaños JP, Almeida A, Moncada S (2010) Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends Biochem Sci.* 2010 Mar;35(3):145-9. doi: 10.1016/j.tibs.2009.10.006. Review.

- Bromfield E, Dworetzky B, Hurwitz S, Eluri Z, Lane L, Replansky S, Mostofsky D (2008) A randomized trial of polyunsaturated fatty acids for refractory epilepsy. *Epilepsy Behav* 12:187–90. doi: 10.1016/j.yebeh.2007.09.011.
- Cahill GF Jr (2006) Fuel metabolism in starvation. *Annu Rev Nutr.* 2006;26:1-22. Review.
- Cahill GF Jr, Herrera MG, Morgan AP, Soeldner JS, Steinke J, Levy PL, Reichard GA Jr, Kipnis DM (1966) Hormone-fuel interrelationships during fasting. *J Clin Invest.* 1966 Nov;45(11):1751-69.
- Cervenka MC, Henry BJ, Felton EA, Patton K, Kossoff EH (2016) Establishing an Adult Epilepsy Diet Center: Experience, efficacy and challenges. *Epilepsy Behav* 58:61–68. doi: 10.1016/j.yebeh.2016.02.038.
- Charriaut-Marlangue C, Aggoun-Zouaoui D, Represa A, Ben-Ari Y (1996) Apoptotic features of selective neuronal death in ischemia, epilepsy and gp 120 toxicity. *Trends Neurosci.* 1996;19:109–114.
- Choi HB, Gordon GR, Zhou N, Tai C, Rungta RL, Martinez J, Milner TA, Ryu JK, McLarnon JG, Tresguerres M, Levin LR, Buck J, MacVicar BA (2012) Metabolic communication between astrocytes and neurons via bicarbonate-responsive soluble adenylyl cyclase. *Neuron.* 2012 Sep 20;75(6):1094-104. doi: 10.1016/j.neuron.2012.08.032.
- Cole JT, Mitala CM, Kundu S, Verma A, Elkind JA, Nissim I, Cohen AS (2010) Dietary branched chain amino acids ameliorate injury-induced cognitive impairment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:366–71. doi: 10.1073/pnas.0910280107.
- Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy (1989) Proposal for Revised Classification of Epilepsies and Epileptic Syndromes. *Epilepsia*, 30: 389–399. doi: 10.1111/j.1528-1157.1989.tb05316.x.
- Conklin HW (1922) Cause and treatment of epilepsy. *J, Am. Osteopath. Assoc.* 1922;26:11–14.
- Contractor, A., Mülle, C., & Swanson, G. T. (2011) Kainate receptors coming of age: milestones of two decades of research. *Trends in Neurosciences*, 34(3), 154–163.
- Coombes JS, McNaughton LR (2000) Effects of branched-chain amino acid supplementation on serum creatine kinase and lactate dehydrogenase after prolonged exercise. *J Sports Med Phys Fitness* 40:240–6.

- Cotter DG, Schugar RC, Crawford PA (2013) Ketone body metabolism and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013 Apr 15;304(8):H1060-76. doi:10.1152/ajpheart.00646.2012. Epub 2013 Feb 8. Review.
- Dallérac GM, Cummings DM, Hirst MC, Milnerwood AJ, Murphy KPSJ (2016) Changes in Dopamine Signalling Do Not Underlie Aberrant Hippocampal Plasticity in a Mouse Model of Huntington's Disease. *NeuroMolecular Med*. doi: 10.1007/s12017-016-8384-z.
- Dallérac GM, Vatsavayai SC, Cummings DM, Milnerwood AJ, Peddie CJ, Evans KA, Walters SW, Rezaie P, Hirst MC, Murphy KPSJ (2011) Impaired Long-Term Potentiation in the Prefrontal Cortex of Huntington's Disease Mouse Models: Rescue by D(1) Dopamine Receptor Activation. *Neurodegener Dis* 8:230–9. doi: 10.1159/000322540.
- DeGiorgio CM, Miller PR, Harper R, Gornbein J, Schrader L, Soss J, Meymandi S (2015) Fish oil (n-3 fatty acids) in drug resistant epilepsy: a randomised placebo-controlled crossover study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 86:65–70. doi: 10.1136/jnnp-2014-307749.
- Donevan SD, White HS, Anderson GD, Rho JM (2003) Voltage-dependent block of N-methyl-D-aspartate receptors by the novel anticonvulsant dibenzylamine, a bioactive constituent of L-(+)-beta-hydroxybutyrate. *Epilepsia* 44:1274–9.
- Evangelidou A, Spilioti M, Doulioglou V, Kalaidopoulou P, Ilias A, Skarpalezou A, Katsanika I, Kalamitsou S, Vasilaki K, Chatziioanidis I, Garganis K, Pavlou E, Varlamis S, Nikolaidis N (2009) Branched chain amino acids as adjunctive therapy to ketogenic diet in epilepsy: pilot study and hypothesis. *J Child Neurol* 24:1268–72. doi: 10.1177/0883073809336295.
- Fernstrom JD (2005) Branched-chain amino acids and brain function. *J Nutr* 135:1539S–46S.
- Fleming P, Godwin M (2013) Low-glycaemic index diets in the management of blood lipids: a systematic review and meta-analysis. *Fam Pract* 30:485–91. doi: 10.1093/fampra/cmt029.
- Fraser DD, Whiting S, Andrew RD, Macdonald EA, Musa-Veloso K, Cunnane SC (2003) Elevated polyunsaturated fatty acids in blood serum obtained from children on the ketogenic diet. *Neurology* 60:1026–9.
- Freche D, Lee C-Y, Rouach N, Holzman D (2012) Synaptic transmission in neurological disorders dissected by a quantitative approach. *Commun Integr Biol* 5:448–52. doi: 10.4161/cib.20818.

- Freeman JM, Kelly MT, Freeman JB (1994) The Epilepsy Diet Treatment: An Introduction to the Ketogenic Diet, 1st ed. Demos, New York, 1994.
- Freeman JM, Kossoff EH, Hartman AL (2007) The ketogenic diet: one decade later. *Pediatrics* 119:535–43. doi: 10.1542/peds.2006-2447.
- Gelisse P, Thomas P, Engrand N, Navarro V, Crespel A (2009) Electroencephalography in status epilepticus: Glossary, protocol and interpretation. *Rev Neurol (Paris)*. 2009 Apr;165(4):398-403. doi: 10.1016/j.neurol.2009.01.032. Epub 2009 Mar 10. Review. French.
- Geyelin HR. (1921) Fasting as a method for treating epilepsy. *Med Rec* 99:1037–1039.
- Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N (2010) Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci*. 2010 Feb;11(2):87-99. doi: 10.1038/nrn2757. Review.
- Goldenholz DM, Ahlfors SP, Hämäläinen MS, et al. (2009) Mapping the Signal-To-Noise-Ratios of Cortical Sources in Magnetoencephalography and Electroencephalography. *Human brain mapping*. 2009;30(4):1077-1086. doi:10.1002/hbm.20571.
- Goyal MS, Hawrylycz M, Miller JA, Snyder AZ, Raichle ME (2014) Aerobic glycolysis in the human brain is associated with development and neotenus gene expression. *Cell Metab*. 2014 Jan 7;19(1):49-57. doi: 10.1016/j.cmet.2013.11.020.
- Granata T, Marchi N, Carlton E, Ghosh C, Gonzalez-Martinez J, Alexopoulos A V, Janigro D (2009) Management of the patient with medically refractory epilepsy. *Expert Rev Neurother* 9:1791–802. doi: 10.1586/ern.09.114.
- Guelpa G, Marie A. (1911) La lutte contre l'épilepsie par la désintoxication et par la rééducation alimentaire. *Revue de Thérapie Médico-Chirurgicale* 78:8–13.
- Güzel O, Yılmaz U, Uysal U, Arslan N (2016) The effect of olive oil-based ketogenic diet on serum lipid levels in epileptic children. *Neurol Sci* 37:465–470. doi: 10.1007/s10072-015-2436-2.
- Halestrap AP (2013) Monocarboxylic acid transport. *Compr Physiol*. 2013 Oct;3(4):1611-43. doi: 10.1002/cphy.c130008. Review.

- Halim ND, Mcfate T, Mohyeldin A, Okagaki P, Korotchkina LG, Patel MS, Jeoung NH, Harris RA, Schell MJ, Verma A (2010) Phosphorylation status of pyruvate dehydrogenase distinguishes metabolic phenotypes of cultured rat brain astrocytes and neurons. *Glia*. 2010 Aug;58(10):1168-76. doi: 10.1002/glia.20996.
- Hämäläinen M, Hari R, Ilmomeni RJ et al (1993) Magnetoencephalography - Theory, instrumentation, and applications to noninvasive studies of the working human brain. *Rev. of Mod. Phys* 65,413-497.
- Hamberger A, Hyden H (1963) Inverse enzymatic changes in neurons and glia during increased function and hypoxia. *J Cell Biol*. 1963 Mar;16:521-5.
- Harris JJ, Jolivet R, Attwell D (2012) Synaptic energy use and supply. *Neuron*. 2012 Sep 6;75(5):762-77. doi: 10.1016/j.neuron.2012.08.019. Review.
- Hebert AS, Dittenhafer-Reed KE, Yu W, Bailey DJ, Selen ES, Boersma MD, Carson JJ, Tonelli M, Balloon AJ, Higbee AJ, Westphall MS, Pagliarini DJ, Prolla TA, Assadi-Porter F, Roy S, Denu JM, Coon JJ (2013) Calorie restriction and SIRT3 trigger global reprogramming of the mitochondrial protein acetylome. *Mol Cell*. 2013 Jan 10;49(1):186-99. doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.024.
- Hegardt FG (1999) Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis. *Biochem J*. 1999 Mar 15;338 (Pt 3):569-82. Review.
- Herbert MR, Buckley JA (2013) Autism and dietary therapy: case report and review of the literature. *J Child Neurol* 28:975–82. doi: 10.1177/0883073813488668
- Huffman J, Kossoff E (2006) State of the ketogenic diet (s) in epilepsy. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep*.
- Hutson SM, Lieth E, LaNoue KF (2001) Function of leucine in excitatory neurotransmitter metabolism in the central nervous system. *J Nutr* 131:846S–850S.
- Huttenlocher PR (1976) Ketonemia and seizures: metabolic and anticonvulsant effects of two ketogenic diets in childhood epilepsy. *Pediatr Res* 10:536–40. doi: 10.1203/00006450-197605000-00006
- Huttenlocher PR, Wilbourn AJ, Signore JM (1971) Medium-chain triglycerides as a therapy for intractable childhood epilepsy. *Neurology* 21:1097–103
- Hyden H, Lange PW (1962) A kinetic study of the neuronglia relationship. *J Cell Biol*. 1962 May;13:233-7.

- Hyder F, Patel AB, Gjedde A, Rothman DL, Behar KL, Shulman RG (2006) Neuronal-glial glucose oxidation and glutamatergic-GABAergic function. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006 Jul;26(7):865-77. Review.
- Hyder F, Rothman DL, Bennett MR (2013) Cortical energy demands of signaling and nonsignaling components in brain are conserved across mammalian species and activity levels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Feb 26;110(9):3549-54. doi:10.1073/pnas.1214912110.
- Itoh Y, Esaki T, Shimoji K, Cook M, Law MJ, Kaufman E, Sokoloff L (2003) Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 15;100(8):4879-84.
- Jackson, G. (2011) Classification of the epilepsies 2011. *Epilepsia*, 52: 1203–1204. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03093.x.
- Jirapinyo P, Kankirawatana P, Densupsoontorn N, Thamonsiri N, Wongarn R (2004) High plasma branched-chain amino acids:aromatic amino acids ratio in children on the ketogenic diet: a mechanism in controlling epilepsy. *J Med Assoc Thai* 87:432–7.
- Juanola-Falgarona M, Salas-Salvadó J, Buil-Cosiales P, Corella D, Estruch R, Ros E, Fitó M, Recondo J, Gómez-Gracia E, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventós RM, Serra-Majem L, Pintó X, Muñoz MA, Ruiz-Gutiérrez V, Alfredo Martínez J, Castro-Quezada I, Bulló M, PREvencion con Dieta MEDiterranea Study Investigators (2015) Dietary Glycemic Index and Glycemic Load Are Positively Associated with Risk of Developing Metabolic Syndrome in Middle-Aged and Elderly Adults. *J Am Geriatr Soc* 63:1991–2000. doi: 10.1111/jgs.13668.
- Juge N, Gray J a., Omote H, Miyaji T, Inoue T, Hara C, Uneyama H, Edwards RH, Nicoll R a., Moriyama Y (2010) Metabolic Control of Vesicular Glutamate Transport and Release. *Neuron* 68:99–112. doi: 10.1016/j.neuron.2010.09.002.
- Kang H-C, Lee HS, You SJ, Kang DC, Ko T-S, Kim HD (2007) Use of a modified Atkins diet in intractable childhood epilepsy. *Epilepsia* 48:182–6. doi: 10.1111/j.1528-1167.2006.00910.x
- Klein P, Janousek J, Barber A, Weissberger R (2010) Ketogenic diet treatment in adults with refractory epilepsy. *Epilepsy Behav* 19:575–579. doi: 10.1016/j.yebeh.2010.09.016
- Koba T, Hamada K, Sakurai M, Matsumoto K, Hayase H, Imaizumi K, Tsujimoto H, Mitsuzono R (2007) Branched-chain amino acids supplementation attenuates the accumulation of blood lactate dehydrogenase during distance running. *J Sports Med Phys Fitness* 47:316–22.

- Koeslag JH, Noakes TD, Sloan AW (1980) Post-exercise ketosis. *J Physiol.* 1980 Apr;301:79-90.
- Kossoff EH, McGrogan JR, Bluml RM, Pillas DJ, Rubenstein JE, Vining EP (2006) A modified Atkins diet is effective for the treatment of intractable pediatric epilepsy. *Epilepsia* 47:421–4. doi: 10.1111/j.1528-1167.2006.00438.x.
- Kossoff EH, Rowley H, Sinha SR, Vining EPG (2008) A prospective study of the modified Atkins diet for intractable epilepsy in adults. *Epilepsia* 49:316–9. doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01256.x.
- Kritchevsky D, Tepper SA (1965) Influence of Medium-chain Triglyceride(MCT) on Cholesterol Metabolism in Rats. *J Nutr* 86:67–72.
- Kwan P, Brodie MJ (2000) Epilepsy after the first drug fails: substitution or add-on? *Seizure* 9:464–8. doi: 10.1053/seiz.2000.0442.
- Lacombe VA, Hinchcliff KW, Kohn CW, Reed SM, Taylor LE (2006) Effects of dietary glycaemic response after exercise on blood concentrations of substrates used indirectly for muscle glycogenesis. *Equine Vet J Suppl* 585–9. doi: 10.1111/j.2042-3306.2006.tb05609.x.
- Lennie P (2003) The cost of cortical computation. *Curr Biol.* 2003 Mar 18;13(6):493-7.
- Lennox WG, Lennox MA (1960) *Epilepsy and Related Disorders*, Vol. 2. Little, Brown, Boston, 1960, pp.735–739.
- Li H, Liu H, Chen J, Li L, Wang H, Li J, Wang L (2015) Relationship between Glycemic Load and Blood Lipid Level in Hospitalized Adult Chinese. *Iran J Public Health* 44:318–24.
- Lim MM, Elkind J, Xiong G, Galante R, Zhu J, Zhang L, Lian J, Rodin J, Kuzma NN, Pack AI, Cohen AS (2013) Dietary therapy mitigates persistent wake deficits caused by mild traumatic brain injury. *Sci Transl Med* 5:215ra173. doi: 10.1126/scitranslmed.3007092.
- Liu YC, Wang H-S (2012) Medium-chain triglyceride ketogenic diet, an effective treatment for drug-resistant epilepsy and a comparison with other ketogenic diets. *Biomed J* 36:9–15. doi: 10.4103/2319-4170.107154.
- Liu Y-MC, Williams S, Basualdo-Hammond C, Stephens D, Curtis R (2003) A prospective study: Growth and nutritional status of children treated with the ketogenic diet. *J Am Diet Assoc* 103:707–712. doi: 10.1053/jada.2003.50136.

- Livesey G, Taylor R, Hulshof T, Howlett J (2008) Glycemic response and health--a systematic review and meta-analysis: relations between dietary glycemic properties and health outcomes. *Am J Clin Nutr* 87:258S–268S.
- Livingston S (1972) *Comprehensive Management of Epilepsy in Infancy, Childhood, and Adolescence*. Charles C Thomas, Springfield, IL, 1972, pp. 378–405.
- Magistretti PJ (2009) Neuroscience. Low-cost travel in neurons. *Science*. 2009 Sep 11;325(5946):1349-51. doi: 10.1126/science.1180102.
- Magistretti PJ, Allaman I (2015) A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. *Neuron*. 2015 May 20;86(4):883-901. doi: 10.1016/j.neuron.2015.03.035. Review.
- Mak SC, Chi CS, Wan CJ (1999) Clinical experience of ketogenic diet on children with refractory epilepsy. *Acta Paediatr Taiwan* 40:97–100.
- Manteca X (2011) Nutrition and Behavior in Senior Dogs. *Top Companion Anim Med* 26:33–36. doi: 10.1053/j.tcam.2011.01.003.
- Mastriani KS, Williams VC, Hulsey TC, Wheless JW, Maria BL (2008) Evidence-based versus reported epilepsy management practices. *J Child Neurol*. 2008 May;23(5):507-14.
- McKenna MC (2007) The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res*. 2007 Nov 15;85(15):3347-58. Review.
- McNally MA, Hartman AL (2012) Ketone bodies in epilepsy. *J Neurochem* 121:28–35. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07670.x.
- Milnerwood AJ, Cummings DM, Dallérac GM, Brown JY, Vatsavayai SC, Hirst MC, Rezaie P, Murphy KPSJ (2006) Early development of aberrant synaptic plasticity in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 15:1690–703. doi: 10.1093/hmg/ddl092
- Milton J. et al. (eds.) (2003) *Epilepsy as a Dynamic Disease* © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2003 2 J.
- Min HS, Kang JY, Sung J, Kim MK (2016) Blood Triglycerides Levels and Dietary Carbohydrate Indices in Healthy Koreans. *J Prev Med public Heal = Yebang Uihakhoe chi* 49:153–64. doi: 10.3961/jpmph.16.014.
- Mink JW, Blumenshine RJ, Adams DB (1981) Ratio of central nervous system to body metabolism in vertebrates: its constancy and functional basis. *Am J Physiol*. 1981 Sep;241(3):R203-12.

- Miranda MJ, Turner Z, Magrath G (2012) Alternative diets to the classical ketogenic diet--can we be more liberal? *Epilepsy Res* 100:278–85. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2012.06.007.
- Mosek A, Natour H, Neufeld MY, Shiff Y, Vaisman N (2009) Ketogenic diet treatment in adults with refractory epilepsy: A prospective pilot study. *Seizure* 18:30–33. doi: 10.1016/j.seizure.2008.06.001.
- Moshé SL, Perucca E, Ryvlin P, Tomson T (2014) Epilepsy: new advances. *Lancet* 385:884–98. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60456-6.
- Münch G, Westcott B, Menini T, Gugliucci A (2012) Advanced glycation endproducts and their pathogenic roles in neurological disorders. *Amino Acids*. Apr;42(4):1221-36. doi: 10.1007/s00726-010-0777-y. Review.
- Muzykewicz DA, Lyczkowski DA, Memon N, Conant KD, Pfeifer HH, Thiele EA (2009) Efficacy, safety, and tolerability of the low glycemic index treatment in pediatric epilepsy. *Epilepsia* 50:1118–26. doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01959.x.
- Nagasaka H, Hirano K, Ohtake A, Miida T, Takatani T, Murayama K, Yorifuji T, Kobayashi K, Kanazawa M, Ogawa A, Takayanagi M (2007) Improvements of hypertriglyceridemia and hyperlacticemia in Japanese children with glycogen storage disease type Ia by medium-chain triglyceride milk. *Eur J Pediatr* 166:1009–16. doi: 10.1007/s00431-006-0372-0.
- Nałecz KA, Nałecz MJ (1993) Transport and metabolic effects of carnitine and acylcarnitines in brain. *Acta Biochim Pol*. 1993;40(3):337-43. Review.
- Neal EG, Chaffe H, Schwartz RH, Lawson MS, Edwards N, Fitzsimmons G, Whitney A, Cross JH (2008) The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomised controlled trial. *Lancet Neurol* 7:500–6. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70092-9.
- Neal EG, Chaffe H, Schwartz RH, Lawson MS, Edwards N, Fitzsimmons G, Whitney A, Cross JH (2009) A randomized trial of classical and medium-chain triglyceride ketogenic diets in the treatment of childhood epilepsy. *Epilepsia* 50:1109–17. doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01870.x.
- Negele L, Schneider B, Ristl R, Stulnig TM, Willfort-Ehringer A, Helk O, Widhalm K (2015) Effect of a low-fat diet enriched either with rapeseed oil or sunflower oil on plasma lipoproteins in children and adolescents with familial hypercholesterolaemia. Results of a pilot study. *Eur J Clin Nutr* 69:337–43. doi: 10.1038/ejcn.2014.234.

- Newman JC, Verdin E (2014) Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends Endocrinol Metab.* 2014 Jan;25(1):42-52. doi: 10.1016/j.tem.2013.09.002. Epub 2013 Oct 18. Review.
- Nosaka N, Suzuki Y, Nagatoishi A, Kasai M, Wu J, Taguchi M (2009) Effect of ingestion of medium-chain triacylglycerols on moderate- and high-intensity exercise in recreational athletes. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 55:120–5.
- Nunez P.I. , R.B. Silberstein, P.J. Cadusch, R.S. Wijesinghe, A.F. Westdorp, R. Srinivasan (1994) A theoretical and experimental study of high resolution EEG based on surface Laplacians and cortical imaging. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 90 (1) (1994), pp. 40–57 (Jan).
- Ono J, Vieth RF, Walson PD (1990) Electrocorticographical observation of seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ) injection in rats. *Funct Neurol* 5:345–52.
- Panayiotopoulos, C. P. (2012) The new ILAE report on terminology and concepts for the organization of epilepsies: Critical review and contribution. *Epilepsia*, 53: 399–404. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03381.x
- 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.* 1994 Oct 25;91(22):10625-9.
- Pellerin L, Magistretti PJ (2012) Sweet sixteen for ANLS. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 Jul;32(7):1152-66. doi: 10.1038/jcbfm.2011.149. Review.
- Perera TD, Lubner B, Nobler MS, Prudic J, Anderson C, Sackeim HA (2004) Seizure expression during electroconvulsive therapy: relationships with clinical outcome and cognitive side effects. *Neuropsychopharmacology* 29:813–25. doi: 10.1038/sj.npp.1300377.
- Peterman MG(1925) The ketogenic diet in epilepsy. *JAMA* 1925;84(26):1979–1983.
- Pfeifer HH, Lyczkowski DA, Thiele EA (2008) Low glycemic index treatment: implementation and new insights into efficacy. *Epilepsia* 49 Suppl 8:42–5. doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01832.x.
- Pfeifer HH, Thiele EA (2005) Low-glycemic-index treatment: a liberalized ketogenic diet for treatment of intractable epilepsy. *Neurology* 65:1810–2. doi: 10.1212/01.wnl.0000187071.24292.9e.
- Pierre K, Pellerin L (2005) Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem.* 2005 Jul;94(1):1-14. Review.

- Porta N, Bourgois B, Galabert C, Lecoïnte C, Cappy P, Bordet R, Vallée L, Auvin S (2009) Anticonvulsant effects of linolenic acid are unrelated to brain phospholipid cell membrane compositions. *Epilepsia* 50:65–71. doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01723.x.
- Quant PA, Tubbs PK, Brand MD (1990) Glucagon activates mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase in vivo by decreasing the extent of succinylation of the enzyme. *Eur J Biochem.* 1990 Jan 12;187(1):169-74.
- Rangaraju V, Calloway N, Ryan TA (2014) Activity-driven local ATP synthesis is required for synaptic function. *Cell.* 2014 Feb 13;156(4):825-35. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.042.
- Rardin MJ, Newman JC, Held JM, Cusack MP, Sorensen DJ, Li B, Schilling B, Mooney SD, Kahn CR, Verdin E, Gibson BW (2013) Label-free quantitative proteomics of the lysine acetylome in mitochondria identifies substrates of SIRT3 in metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Apr 16;110(16):6601-6. doi: 10.1073/pnas.1302961110.
- Reger MA, Henderson ST, Hale C, Cholerton B, Baker LD, Watson GS, Hyde K, Chapman D, Craft S (2004) Effects of β -hydroxybutyrate on cognition in memory-impaired adults. *Neurobiol Aging.* doi: 10.1016/S0197-4580(03)00087-3.
- Riban V, Bouilleret V, Pham-Lê BT, Fritschy J-M, Marescaux C, Depaulis A (2002) Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 112:101–111. doi: 10.1016/S0306-4522(02)00064-7.
- Robinson AM, Williamson DH (1980) Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol Rev.* 1980 Jan;60(1):143-87. Review.
- Ross DL, Swaiman KF, Torres F, Hansen J (1985) Early biochemical and EEG correlates of the ketogenic diet in children with atypical absence epilepsy. *Pediatr Neurol* 1:104–108. doi: 10.1016/0887-8994(85)90045-1.
- Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C (2008) Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science.* 2008 Dec 5;322(5907):1551-5. doi: 10.1126/science.1164022.
- Ruminot I, Gutiérrez R, Peña-Münzenmayer G, Añazco C, Sotelo-Hitschfeld T, Lerchundi R, Niemeyer MI, Shull GE, Barros LF (2011) NBCe1 mediates the acute stimulation of astrocytic glycolysis by extracellular K⁺. *J Neurosci.* 2011 Oct 5;31(40):14264-71. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2310-11.2011.

- Sada N, Lee S, Katsu T, Otsuki T, Inoue T (2015) Targeting LDH enzymes with a stiripentol analog to treat epilepsy. *Science* (80-) 347:1362–1367. doi: 10.1126/science.aaa1299.
- Schlanger S, Shinitzky M, Yam D (2002) Diet enriched with omega-3 fatty acids alleviates convulsion symptoms in epilepsy patients. *Epilepsia* 43:103–4.
- Schwartz RH, Eaton J, Bower BD, Aynsley-Green A (1989) Ketogenic diets in the treatment of epilepsy: short-term clinical effects. *Dev Med Child Neurol* 31:145–51.
- Sengupta S, Peterson TR, Laplante M, Oh S, Sabatini DM (2010) mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature*. 2010 Dec 23;468(7327):1100-4. doi: 10.1038/nature09584.
- Sharma A, Bemis M, Desilets AR (2014) Role of Medium Chain Triglycerides (Axona®) in the Treatment of Mild to Moderate Alzheimer's Disease. *Am J Alzheimers Dis Other Dement* 29:409–14. doi: 10.1177/1533317513518650.
- Shimazu T, Hirschey MD, Hua L, Dittenhafer-Reed KE, Schwer B, Lombard DB, Li Y, Bunkenborg J, Alt FW, Denu JM, Jacobson MP, Verdin E (2010) SIRT3 deacetylates mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase 2 and regulates ketone body production. *Cell Metab*. 2010 Dec 1;12(6):654-61. doi: 10.1016/j.cmet.2010.11.003.
- Shirai K, Kobayashi J, Inadera H, Ohkubo Y, Mori S, Saito Y, Yoshida S (1992) Type I hyperlipoproteinemia caused by lipoprotein lipase defect in lipid-interface recognition was relieved by administration of medium-chain triglyceride. *Metabolism* 41:1161–1164. doi: 10.1016/0026-0495(92)90003-S.
- Shorvon, S. D. (2011) The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia*, 52: 1052–1057. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03041.x.
- Sills MA, Forsythe WI, Haidukewych D, MacDonald A, Robinson M (1986) The medium chain triglyceride diet and intractable epilepsy. *Arch Dis Child* 61:1168–1172. doi: 10.1136/adc.61.12.1168.
- 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* 40:1721–6.
- Socala K, Nieoczym D, Pierog M, Wlaz P (2015) Role of the adenosine system and glucose restriction in the acute anticonvulsant effect of caprylic acid in the 6Hz psychomotor seizure test in mice. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 57:44–51. doi: 10.1016/j.pnpbp.2014.10.006.

- Sorg O, Magistretti PJ (1991) Characterization of the glycogenolysis elicited by vasoactive intestinal peptide, noradrenaline and adenosine in primary cultures of mouse cerebral cortical astrocytes. *Brain Res.* 1991 Nov 1;563(1-2):227-33.
- Sorg O, Pellerin L, Stolz M, Beggah S, Magistretti PJ (1995) Adenosine triphosphate and arachidonic acid stimulate glycogenolysis in primary cultures of mouse cerebral cortical astrocytes. *Neurosci Lett.* 1995 Mar 24;188(2):109-12.
- Stannard SR, Constantini NW, Miller JC (2000) The effect of glycemic index on plasma glucose and lactate levels during incremental exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 10:51–61.
- Stobart JL, Anderson CM (2013) Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply. *Front Cell Neurosci.* 2013 Apr 10;7:38. doi: 10.3389/fncel.2013.00038.
- Suzuki F, Junier MP, Guilhem D, Sørensen JC, Onteniente B (1995) Morphogenetic effect of kainate on adult hippocampal neurons associated with a prolonged expression of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience.* 1995 Feb;64(3):665-74.
- Thio LL, Wong M, Yamada KA (2000) Ketone bodies do not directly alter excitatory or inhibitory hippocampal synaptic transmission. *Neurology* 54:325–31.
- Tigerholm J, Börjesson SI, Lundberg L, Elinder F, Fransén E (2012) Dampening of Hyperexcitability in CA1 Pyramidal Neurons by Polyunsaturated Fatty Acids Acting on Voltage-Gated Ion Channels. *PLoS One* 7:e44388. doi: 10.1371/journal.pone.0044388.
- Timsit, S., Rivera, S., Ouaghi, P., Guischard, F., Tremblay, É., Ben-Ari, Y. and Khrestchatisky, M. (1999) Increased cyclin D1 in vulnerable neurons in the hippocampus after ischaemia and epilepsy: a modulator of in vivo programmed cell death?. *European Journal of Neuroscience*, 11: 263–278. doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00434.x.
- Trauner DA (1985) Medium-chain triglyceride (MCT) diet in intractable seizure disorders. *Neurology* 35:237–237. doi: 10.1212/WNL.35.2.237.
- Vaishnavi SN, Vlassenko AG, Rundle MM, Snyder AZ, Mintun MA, Raichle ME (2010) Regional aerobic glycolysis in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Oct 12;107(41):17757-62. doi: 10.1073/pnas.1010459107.
- Van Delft R, Lambrechts D, Verschuure P, Hulsman J, Majoie M (2010) Blood beta-hydroxybutyrate correlates better with seizure reduction due to ketogenic diet than do ketones in the urine. *Seizure* 19:36–39. doi: 10.1016/j.seizure.2009.10.009.

- Van Zyl CG, Lambert E V, Hawley JA, Noakes TD, Dennis SC (1996) Effects of medium-chain triglyceride ingestion on fuel metabolism and cycling performance. *J Appl Physiol* 80:2217–25.
- Vining EPG (2008) Long-term health consequences of epilepsy diet treatments. *Epilepsia* 49:27–29. doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01828.x.
- von Meyenn F, Porstmann T, Gasser E, Selevsek N, Schmidt A, Aebersold R, Stoffel M (2013) Glucagon-induced acetylation of Foxa2 regulates hepatic lipid metabolism. *Cell Metab.* 2013 Mar 5;17(3):436-47. doi: 10.1016/j.cmet.2013.01.014.
- Voskuyl RA, Vreugdenhil M, Kang JX, Leaf A (1998) Anticonvulsant effect of polyunsaturated fatty acids in rats, using the cortical stimulation model. *Eur J Pharmacol* 341:145–52.
- Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science*. Feb 24;123(3191):309-14.
- Ward PS, Thompson CB (2012) Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell*. 2012 Mar 20;21(3):297-308. doi:10.1016/j.ccr.2012.02.014. Review.
- Wheless JW (1995) The ketogenic diet: Fa(c)t or fiction. *J Child Neurol*. Nov;10(6):419-23.
- Wheless, J W (2008) History of the ketogenic diet. *Epilepsia*, 49: 3–5. doi:10.1111/j.1528-1167.2008.01821.x.
- Wieser HG (2004) ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia* 2004;45:695–14.
- Wilder RM (1921) The effect on ketonemia on the course of epilepsy. *Mayo Clin Bull* 1921;2:307
- Wolfrum C, Besser D, Luca E, Stoffel M (2003) Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 30;100(20):11624-9.
- Woodyatt RT (1921) Objects and method of diet adjustment in diabetics. *Arch Intern Med* 1921;28:125–141.
- Yehuda S, Carasso RL, Mostofsky DI (1994) Essential fatty acid preparation (SR-3) raises the seizure threshold in rats. *Eur J Pharmacol* 254:193–8.

- Yuen AWC, Flugel D, Poepel A, Bell GS, Peacock JL, Sander JW (2012) Non-randomized open trial of eicosapentaenoic acid (EPA), an omega-3 fatty acid, in ten people with chronic epilepsy. *Epilepsy Behav.* doi: 10.1016/j.yebeh.2011.11.030
- Zamani GR, Mohammadi M, Ashrafi MR, Karimi P, Mahmoudi M, Badv RS, Tavassoli AR, Azizi Malamiri R (2016) The effects of classic ketogenic diet on serum lipid profile in children with refractory seizures. *Acta Neurol Belg.* doi: 10.1007/s13760-016-0601-x.
- Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keeffe S, Phatnani HP, Guarnieri P, Caneda C, Ruderisch N, Deng S, Liddelow SA, Zhang C, Daneman R, Maniatis T, Barres BA, Wu JQ (2014) An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci.* 2014 Sep 3;34(36):11929-47. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014. Erratum in: *J Neurosci.* 2015 Jan 14;35(2):846-6.
- Zucker RS (1973) Changes in the statistics of transmitter release during facilitation. *J Physiol* 229:787–810.

Annexe 1 : Principe de l'EEG

Classiquement l'électroencéphalographie est une méthode non invasive faisant appel à une multitude de capteurs positionnés sur le scalp de façon bien ordonné, formant ainsi un réseau pouvant aller jusqu'à plusieurs centaines d'électrodes qui permettent l'enregistrement en temps réel de l'activité cérébrale en mesurant des différences de potentiel, qui résultent de la synchronisation de macro-colonne de dizaine de milliers de neurones pyramidaux au niveau cortical, chaque ensemble créant un courant de l'ordre de 10 Nanoampère/mètre (Hämäläinen *et al.*, 1993). Une vision simplifiée est que chaque neurone composant ces couches peut être perçu comme un dipôle électrique ayant un arrangement spatial qui présente les dendrites apicales plus en surface et en profondeur l'axone et le soma orienté vers la substance blanche. Les activités enregistrées sont principalement dues au mouvement d'ions au niveau des synapses dans l'arbre dendritique. En effet, les potentiels post-synaptiques excitateurs (entrée de charge positive dans le milieu intracellulaire) de cette partie se somment entre eux et en regard de la différence de potentiel dans le soma non excité (repos) engendre dans le neurone un courant primaire, qui à son tour va créer un courant secondaire (courant volumique, extracellulaire) qui permettra la conservation de la charge. Les potentiels d'actions transitant le long de l'axone sont trop faibles pour être capté à l'extérieur du crâne ; s'éloignant du scalp ils sont plus difficiles à percevoir. Les signaux récupérés fournissent par le biais d'amplificateur des informations sur l'activité électrique cérébrale à deux niveaux : 1/ une information temporelle extrêmement précise de l'ordre de quelques millisecondes (Nunez *et al.*, 1994), 2/ la caractérisation spatiale des variations des potentiels électriques. Il existe cependant une limite de résolution spatiale qui empêche la détection de certaines variations de potentiels. (Figure 20)

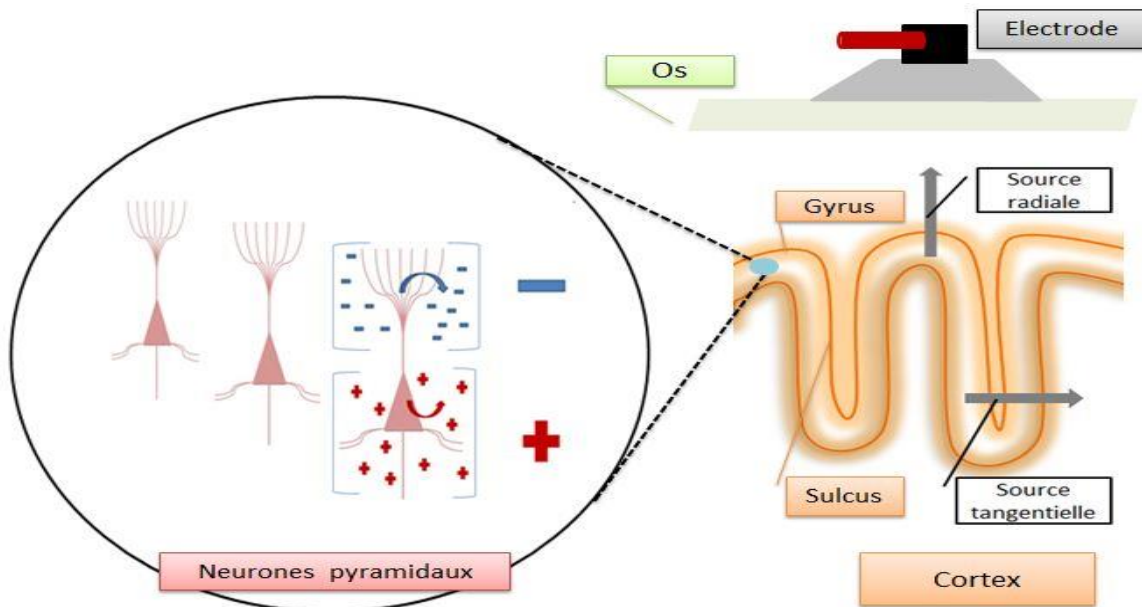


Figure 20. Illustration des principes biophysiques de bases dans la mesure des activités cérébrales. À droite, illustration représentant l'arrangement spatiale des différentes sources permettant l'acquisition de signaux par l'EEG chez l'humain non primate. A gauche, vue de neurones pyramidaux soumis à des dépolarisations au niveau des dendrites, qui pour un court lapse de temps créeront en regard du soma (dans un état non excité) un dipôle qui générera un champ électrique.

Annexe 2 : Etiologie et terminologies rencontrées dans l'étude de l'épilepsie

Afin d'éclairer notre compréhension commune des termes employés lors de la description et de l'analyse des événements observés dans l'étude des tracés électroencéphalographique, un glossaire récapitulant quelques définitions est proposé, celui-ci est issu du rapport de P.Gelisse (Gelisse *et al.*, 2009).

Bouffée :

Groupement de plusieurs éléments d'apparition soudaine se détachant nettement du rythme de fond. Une bouffée peut être physiologique ou pathologique.

Critique (ictal):

Une activité critique correspond à une crise d'épilepsie qu'elle soit clinique ou infraclinique. Elle s'oppose à une activité intercritique (interictal), activité survenant sans relation avec les crises et qui est habituellement brève. Une activité post-critique correspond aux activités enregistrées au décours d'une crise d'épilepsie.

Décharge :

Bouffée de plusieurs secondes. Une décharge peut ne pas être pathologique, mais ce terme est souvent employé pour décrire une activité épileptique.

Foyer:

Région où siège de façon prédominante une activité épileptique

Paroxysme:

Activité EEG se détachant nettement du rythme de fond.

Activités paroxystiques élémentaires :

- L'onde : toute différence de potentiel entre deux électrodes qui se traduit par un paroxysme EEG
- La pointe : paroxysme EEG de brève durée (20 à 70 ms)
- La pointe lente ou onde aiguë (sharp wave) : pointe de grande amplitude d'une durée comprise entre 70 et 200 ms ayant ainsi un aspect moins aigu qu'une pointe
- Les pointes ondes : pointe suivie d'une onde lente de même polarité. Suivant le nombre de cycle par seconde des paroxysmes, on distingue les pointes ondes lentes qui sont à 2,5c/s ou moins, les pointes ondes à 3c/s et les pointes ondes rapides qui sont supérieures à 3c/s, habituellement à 4
- Les polypointes : succession de deux ou plusieurs pointes
- Les polypointes ondes : succession de pointes suivie immédiatement d'une onde lente
- L'onde triphasique : onde lente comportant trois composantes qui alternent par rapport à la ligne de base. Cette activité se répète de façon rythmique de 1 à 3c/s
- Le complexe lent : séquence de deux ou de plusieurs ondes lentes habituellement de grande amplitude.

Description des activités paroxystiques en fonction de l'espace ;

- L'activité focale : activité qui implique une région cérébrale précise et limitée
- L'activité localisée : activité qui implique plusieurs électrodes voisines (plus étendue que la précédente)
- L'activité latéralisée : activité qui implique l'ensemble des électrodes d'un hémisphère
- L'activité diffuse : activité qui se projette sur les deux hémisphères, synchrone ou non
- L'activité généralisée : toutes les électrodes des deux hémisphères sont concernées en règle générale de façon synchrone
- L'activité multifocale : présence de plusieurs foyers indépendants
- L'activité asymétrique : différence entre les deux hémisphères (s'oppose à une activité symétrique)

Description des activités paroxystiques en fonction du temps ;

- L'activité synchrone : activité survenant de façon simultanée
- L'activité bilatérale : activité survenant sur les deux hémisphères, mais qui n'implique pas obligatoirement leur survenue au même instant. Une activité peut être bilatérale et synchrone, c'est le cas des pointes ondes à 3c/s de l'épilepsie d'absence

Description en fonction de la régularité ;

- L'activité monomorphe : activité globalement régulière dans sa morphologie, dans son amplitude et dans sa fréquence
- L'activité polymorphe : variation de l'amplitude, de la fréquence et de la morphologie des ondes

Description en fonction de la répétition ;

- L'activité rythmique : activité survenant régulièrement avec un intervalle de temps équivalent à la durée de l'onde (pas de séparation entre les différents éléments), comme dans le cas de l'épilepsie
- L'activité arythmique : activité survenant de façon irrégulière avec des intervalles de temps variables entre les différents éléments
- L'activité périodique : activité séparée par un intervalle de temps constant qui est supérieur à la durée de l'onde. Cette intervalle est d'une à plusieurs secondes et en fonction de la durée, on distingue les activités à périodicité courte qui sont séparées par un intervalle de temps inférieur ou égal à 4 secondes, et les activités à périodicité longue où l'intervalle de temps est supérieur à 4 secondes.
- L'activité pseudopériodique : l'intervalle de temps séparant les éléments n'est pas tout à fait régulier.

Ralentissement :

Caractérise un tracé avec présence d'ondes lentes en excès. Le ralentissement peut être localisé ou diffus. Un ralentissement peut être physiologique comme lors d'une hyperventilation ou pathologique, on emploiera alors plutôt le terme de souffrance.

Réactivité :

Modification des rythmes observés en réponse à un stimulus sensoriel, moteur ou pharmacologique.

Rythme (activité) de fond :

C'est le rythme de base de l'EEG observé dans l'état de vigilance concerné et suivant l'âge du sujet.

Un autre élément essentiel dans la prise en charge de patient atteint d'épilepsie est la mise en place d'une classification qui permet de définir avec précision les critères nécessaires au bon diagnostic pour un traitement efficace de ces personnes. En effet, suite aux propositions du « current International Classification of Epilepsies and Epileptic Syndromes » (ICE) à la commission de la ligue internationale contre l'épilepsie (ILAE) en 1989, une nouvelle nomenclature a été définie en fonction des patterns électrophysiologiques, des zones du cerveau impliqué, des signes cliniques, ainsi que l'âge au moment des premières crises (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1989).

Sommairement, une crise peut être soit généralisée ou partielle, respectivement, pour la première condition, la crise doit initialement apparaître dans les deux hémisphères cérébraux, présenter une altération de l'activité électrique, être sans origine focale, avec une modification ou une perte de conscience et auquel peut s'ajouter des convulsions. La seconde doit posséder un ou des foyers épileptogéniques restreints à une seule partie du cerveau, ces crises partielles peuvent être soit simples (sans perte de conscience, de courte durée) ou complexes

(altération de la conscience). De plus, il existe un autre degré de complexité qui met en avant le caractère inné ou acquis de l'épilepsie, trois séparations ; la forme idiopathique (nommé quelquefois primaire) du grec *idios* signifie soi, marque l'identité, dans ce contexte cela peut être compris comme non occasionné par une autre cause, le corrélat biologique montre une dominante sans grave anomalie neuroanatomique ou neuropathologique. Au contraire la forme symptomatique (secondaire) est une conséquence indirecte d'un désordre du système nerveux central majoritairement acquis (par exemples : traumatisme, tumeur, infection, troubles cérébrovasculaire, immunologique, dégénératif) ou causé par un problème génique, associé avec d'importants troubles développementaux, congénitaux qui entraînent de graves anomalies neuroanatomique ou neuropathologique. Une troisième catégorie, la forme cryptogénique (du grec *kryptos*, caché) est présumée symptomatique, mais sans cause identifiée (représente au moins 40 % des cas d'épilepsie apparus à l'âge adulte). Quelques fois une quatrième forme peut être rencontrée, l'épilepsie provoquée. Celle-ci est déclenchée par un événement extérieur (comme par exemple la lumière), elle peut être acquise ou innée, mais ne possède pas de cause neuroanatomique ou neuropathologique (Shorvon, 2011).

Cependant, en regard des évolutions techniques d'investigation en imagerie, et électrophysiologie qui au cours des dernières années ont pu apporter de nouvelles connaissances sur les mécanismes sous-tendant l'épilepsie, il a été proposé par l'ILAE (mandat 2005-2009) une révision de la terminologie et des concepts avec pour objectif une classification plus simple (Berg *et al.*, 2010). Pour l'essentiel, le statut généralisé est redéfini par des crises qui impliquent rapidement des réseaux à distribution bilatérale et le statut focal implique des crises localisées, ou une région plus large, ou des réseaux limités à un seul hémisphère. Les crises focales ne sont donc plus divisées en crises simple ou complexe, mais classées selon leurs propriétés cliniques (par exemples : convulsions, déficits moteurs et cognitifs). Les classes idiopathiques, symptomatiques et cryptogéniques sont ainsi remplacées par génétiques, structurelles-métaboliques et causes inconnues (Figure 21). Néanmoins, il existe encore de nombreux débats autour de ces questions, certains experts n'hésitant pas à réclamer plus de flexibilité, clarté et précision à cette nouvelle révision de la classification des épilepsies (Jackson, 2011; Panayiotopoulos, 2012).

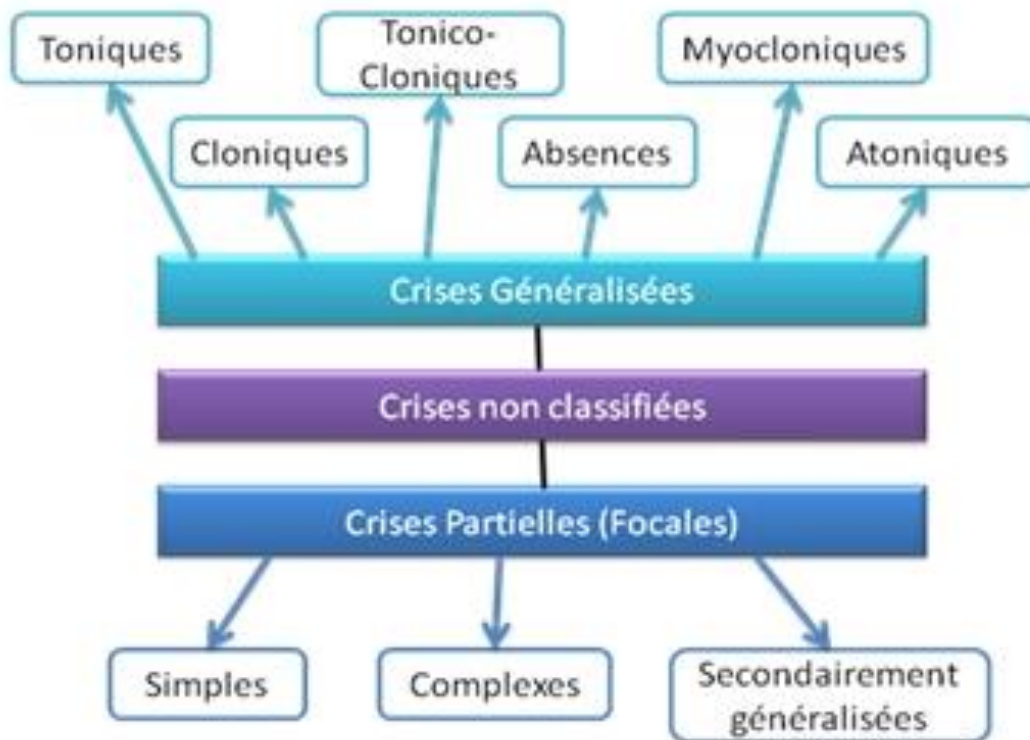


Figure 21. Synthèse des différentes formes d'épilepsies observables selon de leur origine. Sont représentées les différentes formes de crises.
 (D'après [etudes.univ-rennes1.fr/master-biogest/themes/Synthese_bibliographique/sujets_2011_a_2013/Epilepsies_medicaments?auteur=Esnault Marie-Andrée](http://etudes.univ-rennes1.fr/master-biogest/themes/Synthese_bibliographique/sujets_2011_a_2013/Epilepsies_medicaments?auteur=Esnault%20Marie-Andr%C3%A9e))

Annexe 3. Anatomie, structure et organisation de l'hippocampe

L'hippocampe est une structure cérébrale constituée d'allocortex, enroulé sur elle-même et représenté bilatéralement au niveau des lobes temporaux. Il est une des parties du système limbique où il est impliqué dans la formation des processus mémoriaux. Cette couche de neurone peut être divisée en trois compartiments, le subiculum, la corne d'Ammon et le gyrus denté. Ce dernier est un des sièges cérébraux de la neurogenèse avec le bulbe olfactif chez l'adulte. En effet, sa zone granulaire contient des progéniteurs neuronaux qui peuvent se différencier en neurones granulaires, de nombreux facteurs pourraient induire ou ralentir ce mécanisme, tels que les hormones, le stress, l'activité physique et l'apprentissage. La corne d'Ammon, peut être compartimentée en trois principales aires, CA1, CA2 et CA3 en regard de leurs différences morphologiques et de leurs connectivités. La nomenclature utilisée pour décrire la couche de neurones est constituée de plusieurs niveaux, le *stratum pyramidal* est la partie contenant les corps cellulaires de neurones pyramidaux, le *stratum oriens* est la zone où les dendrites des neurones pyramidaux sont dirigées vers l'extérieur de la structure hippocampique, le *stratum radiatum* possède les dendrites proximales des neurones pyramidaux, en CA3 cette aire possède une couche supplémentaire qui se glisse entre la partie du *radiatum* et du *pyramidale*, et se dénomme le *stratum lucidum*, c'est le lieu de connexion avec les axones afférents du gyrus denté, les fibres moussues. Le *stratum moleculare* contient la partie distale des dendrites qui est tournée vers l'intérieur de la structure, en opposition avec le *stratum oriens*. Au niveau du gyrus denté, on rencontre trois couches, le *stratum granulosum* qui est le siège des somas des cellules granulaires, puis le *stratum moleculare* qui regroupe les segments apicaux des dendrites et une couche formée par la partie initiale des axones des cellules granulaires, le *hile*. L'aire CA1 est reliée au CA3 par les collatérales de Schaffer qui sont des axones des cellules pyramidales de cette région. D'autres axones émanant de CA3 se dirigent vers l'hippocampe contralatéral via le corps calleux, ce sont les fibres commissurales. Enfin, les axones des cellules de CA1 rejoignent les neurones du *subiculum* et le cortex entorhinal. L'entrée de cette boucle est réalisée par les fibres perforantes au niveau du gyrus denté, celles-ci sont des afférences du cortex entorhinal (Figure 22)

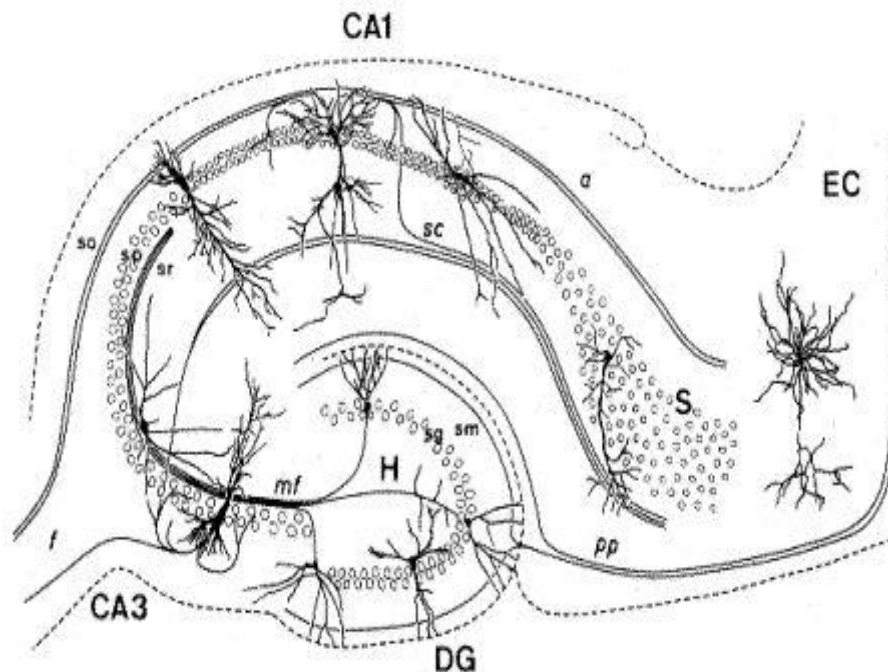


Figure 22. Anatomie structurale de l'hippocampe.

DG, gyrus denté ; CA1/3, corne d'Ammon 1/3 ; EC, cortex entorhinal ; S, subiculum ; pp, voie perforante ; sm, *stratum moleculare* ; sg, *stratum granulosum* ; H, hile ; mf, fibres moussues ; sr, *stratum radiatum* ; sp, *stratum pyramidale* ; so, *stratum oriens* ; sc, collatérales de Schaffer.

(Figure issue de www.unige.ch/cyberdocuments/theses2000/ToniN/these_body.htm)

Annexe 4. Le kaïnate, caractérisation et voies d'actions

L'étude de l'épilepsie peut se faire à travers différents modèles animaux. L'induction d'activités épileptiforme via l'administration d'agents pharmacologiques est fréquemment utilisée. L'un d'eux, le Kaïnate permet de mimer l'épilepsie humaine du lobe temporal avec sclérose hippocampale (TLE). En effet, l'injection de cette substance dans l'hippocampe entraîne immédiatement une ischémie dans la zone injectée (CA1), suivie d'une perte massive de neurone (CA1+CA3), une gliose et l'installation de crises chroniques complexes. Un phénomène intéressant est la cinétique d'apparition des crises. Suite à l'injection et pendant quelques heures, des activités spontanées sont perçues, cette période est nommée *status epilepticus*. Ensuite, un temps de latence d'environ deux semaines est requis pour rentrer dans un nouveau cycle, la phase chronique, qui correspond à la mise en place d'évènements épileptiformes qui seront maintenus dans le temps.

Pendant ces mêmes périodes, il sera possible d'observer la dispersion des cellules granulaires du gyrus denté, corrélat histopathologique retrouvé dans 50 % des TLE humaines (Suzuki *et al.*, 1995 ; Wieser, 2004). Le mécanisme d'action du Kaïnate reste mal défini puisqu'impliquant une multitude de facteurs. En effet, cette drogue qui a été extraite d'algue marine dans les années 80 est un analogue glutamatergique possédant un pouvoir excitateur supérieur aux autres acides aminés neuronaux. Son récepteur ionotrope AMPA/kainate est perméable au potassium et sodium, et est au niveau pré- comme post-synaptique, et module la transmission synaptique ainsi que l'excitabilité neuronale. Dans la circuiterie cérébrale, l'injection de kaïnate entraîne une excitotoxicité sélective de certaine population neuronale. De façon directe, des entrées massives de calcium induisent outre les surexcitations cellulaires, une cascade d'évènement qui conduiront à la mort de nombreuses cellules par apoptose et/ou nécrose selon la concentration de kaïnate et la sévérité des crises (Charriaud-Marlangue *et al.*, 1996 ; Timsit *et al.*, 1999). Une conséquence de ces activités non-physiologiques est la formation de synapses aberrantes causée par le bourgeonnement des fibres mossues. Ces nouvelles connexions ainsi formées dans la région CA3, lieu de haute affinité pour le kaïnate et hautement épileptogène, favoriseront le déclenchement de crises. De plus, la balance

excitation/inhibition (Contractor *et al.*, 2011) qui permet le maintien des oscillations neurales dans un cadre physiologique, est modifiée de telle sorte qu'elle favorise la survenue de crises.

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Étude de stratégies nutritionnelles non-cétogènes dans le traitement de l'épilepsie

Moulard Julien

Date de soutenance

RÉSUMÉ

L'épilepsie est une affection neurologique qui touche 1 % de la population mondiale. Les traitements de cette pathologie ciblent classiquement l'excitabilité neuronale ainsi que la transmission excitatrice ou inhibitrice. Cependant, près d'un tiers des patients présentent une forme d'épilepsie réfractaire à ces médicaments pharmacologiques. La diète cétogène est une approche thérapeutique non-pharmacologique limitant drastiquement les apports glucidiques et connue pour son efficacité à réduire la fréquence des crises, y compris chez les patients pharmacorésistants. Cependant, ce régime est extrêmement restrictif et peut occasionner certaines complications dues à la quantité élevée de lipides par rapport aux concentrations de protéines + glucides. De récents progrès ont montré que le ratio [lipide]/[glucides+protéines] de 4 : 1, traditionnellement utilisé, n'est en réalité pas indispensable aux effets antiépileptiques du traitement cétogène. Dans la présente étude, nous mettons en évidence qu'un régime alimentaire non-cétogène combinant plusieurs stratégies nutritionnelles antiépileptiques ciblant qualitativement les acides aminés, les acides gras et les glucides, a une action anti-épileptique aussi efficace que le régime cétogène, mais présente un ratio [lipide]/[protéines+glucides] se rapprochant du régime non-cétogène standard. Confirmant ces résultats, les corrélations morphologiques et moléculaires caractéristiques de l'épilepsie du lobe temporal sont également moins prononcées chez les animaux nourris avec ce régime combiné. Ces résultats indiquent qu'il est possible d'envisager un régime alimentaire anti-épileptique moins drastique et potentiellement plus sain que la diète cétogène classique.

Mots clés ; EPILEPSIE, DIETE, NON-CETOGENE, PROTECTION, PALATABILITE, LACTATE