



HAL
open science

Acides gras poly-insaturés, activation des récepteurs nucléaires PPAR-alpha, régime cétogène: effet anticonvulsivant chez le rongeur

Natacha Porta

► To cite this version:

Natacha Porta. Acides gras poly-insaturés, activation des récepteurs nucléaires PPAR-alpha, régime cétogène: effet anticonvulsivant chez le rongeur. Neurosciences [q-bio.NC]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2008. Français. NNT : . tel-00343236

HAL Id: tel-00343236

<https://theses.hal.science/tel-00343236>

Submitted on 1 Dec 2008

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.

THESE

Pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Lille II - NEUROSCIENCES

Présentée et soutenue publiquement le 20 octobre 2008

Par Natacha PORTA

ACIDES GRAS POLY-INSATURES, ACTIVATION DES RECEPTEURS NUCLEAIRES PPAR-alpha, REGIME CETOGENE : EFFET ANTICONVULSIVANT CHEZ LE RONGEUR

Jury

Docteur Catherine CHIRON	Rapporteur
Professeur Jacques MOTTE	Rapporteur
Professeur Patrick BERQUIN	Examineur
Docteur Stéphane AUVIN	Examineur
Professeur Louis VALLEE	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à Madame le Docteur Catherine Chiron et à Monsieur le Professeur Jacques Motte pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Merci d'avoir pris sur votre temps précieux pour juger ce travail, et merci à Madame le Docteur Catherine Chiron d'avoir accepté cette fonction au dernier moment.

Je voudrais également remercier Monsieur le Professeur Patrick Berquin et Monsieur le Docteur Stéphane Auvin d'avoir accepté d'être les examinateurs de ce travail.

Un grand merci à Monsieur le Professeur Louis Vallée qui a encadré ces trois années de travail. Merci pour votre dynamisme, pour les réunions d'équipe régulières qui ont su dynamiser le travail de chacun. Merci pour votre disponibilité, malgré un emploi du temps très chargé.

Je tiens à remercier plus particulièrement Monsieur le Docteur Stéphane Auvin qui a été mon interlocuteur privilégié pendant ces trois années et pendant mon Master 2. Merci pour avoir encadré ces travaux depuis Lille et Los Angeles, sans jamais tenir compte du décalage horaire. Merci d'avoir toujours été là, même quand ça n'allait pas. Merci d'avoir cru en moi, même dans les moments difficiles. Merci pour ton aide, pour ton soutien de tous les instants, pour ta grande, que dis-je, pour ton immense disponibilité, pour ton dynamisme, pour le travail nocturne et nos mails de noctambules. Et merci d'avoir autant contribué à la « construction » de la scientifique que je suis devenue. Les mots me manquent pour décrire cette rencontre exceptionnelle, et les mercis paraissent bien dérisoires. Mais ces années de travail et de collaboration resteront profondément gravées dans ma mémoire.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Régis Bordet pour m'avoir accueilli dans son laboratoire où j'ai pu réaliser mes travaux de recherche. Merci d'avoir su intégrer cette thématique dans vos projets, merci pour votre confiance, pour vos précieux conseils. Merci de m'avoir laissé le temps de remonter la pente avec succès.

Je tiens aussi à remercier tout le personnel du laboratoire de Pharmacologie et du service de Neuropédiatrie pour leur gentillesse et leur disponibilité qui ont rendu les moments agréables et joyeux. Merci aux secrétaires de Neuropédiatrie pour le café du matin, moment rebaptisé « en attendant Stéphane !! ». Un merci tout particulier à Christian Sueur pour son aide précieuse lors de la réalisation de la cage de Faraday. Merci aussi aux animaliers (Arnold, Joël, Michel) pour leurs conseils, leur professionnalisme, et leur aide pendant les différents protocoles de nutrition. Merci également à tous les étudiants qui ont croisé ma route durant ces quatre années. Certaines de ces rencontres ont été magiques et pleine de vie....

Je voudrais aussi remercier Madame le Docteur Astrid Nehlig qui était initialement rapporteur de ce travail. Malheureusement, cela n'a pas pu se concrétiser. Il faudra trouver une autre occasion pour enfin se rencontrer !

Je voudrais également remercier Madame le Docteur Claude Galabert pour ses nombreux conseils concernant l'analyse et l'interprétation des dosages des acides gras poly-insaturés, ainsi que pendant la rédaction de ma thèse. Merci pour votre œil expert en la matière !

Je tenais également à remercier mes « sponsors » qui ont financé ces trois années de thèse : le CHRU de Lille, et la région Nord Pas de Calais. Un grand merci également à l'association AEAC qui a permis de financer ce projet de recherche.

Merci à mon binôme, à la fille aux stylos pailletés, à ma blonde préférée, à ma Cécile ! Merci pour ton dynamisme, ta disponibilité, ton aide à la paillasse ! Merci d'avoir sacrifié tes orteils pour la cage de Faraday !! Que vais-je faire sans nos boulettes, nos fous rires, nos coups de folie, nos échanges de mg/kg/mL contre des facteurs de dilution.... Ca va me manquer tout ça ! Tu es une fille géniale, pétillante et qui croque la vie. Tu es appréciée de tous. Ne doutes jamais de cela, sinon tu vas avoir à faire à moi.

Merci à Séverine et à Marie. Il y a des amitiés qui naissent d'un rien, au détour d'un couloir ou dans une salle café... Mais on sait dès le début que c'est fait pour durer. Merci les filles pour vos mots doux, votre soutien régulier au cours de cette année qui a été bien remplie,.... Merci à Séverine d'avoir fait de moi une « tatie naty » comblée.

Merci à Hélène... Pour les moments partagés pendant notre formation à Pasteur, pour tous les moments partagés depuis et pour les moments passés sur les points d'une certaine régression linéaire... Je n'ose plus y penser !! Merci aussi pour tes conseils à la relecture !! J'attends la tienne ! Je te souhaite une belle réussite pour ta thèse qui arrive à grands pas !

Merci à BéWé qui se reconnaîtra.... Merci pour ce coup de pied il y a deux ans... Sans cet électrochoc je crois que je ne serai pas arrivée jusqu'ici. La route a été longue avec des hauts et des bas qui se sont enchaînés mais merci de m'avoir fait comprendre ce que je ne voulais pas comprendre.

Un immense merci à Charlotte pour son aide lors de mes premières implantations et de mes premiers EEG... Un immense merci aussi pour l'opération caméscope !! Sans cette opération je n'aurai pas de vidéos !! Merci du fond du cœur pour ta gentillesse et ta disponibilité, même depuis Rome...

Je voudrais remercier à l'infini mes parents et ma tante. Notre noyau familial est réduit, mais correspond à une merveilleuse bulle d'oxygène et de bonheur. Sans eux trois rien de tout cela ne serait. C'est grâce à vous que j'ai pu faire mes études comme bon me semblait. Vos conseils m'ont aidé tout au long de ces étapes et petit à petit j'ai pu me construire. Grâce à vous j'ai pu gravir les pentes qui me semblaient infranchissables. Merci de m'avoir poussé dans les montées, de m'avoir freiné dans les descentes et de m'avoir tendu la main à plusieurs reprises pour franchir les obstacles rencontrés.... Avoir des parents aussi géniaux ce n'est pas donné à tout le monde.

Je voudrais remercier ma grand-mère... Partie trop tôt, trop vite pendant ma thèse... Je te dédie toutes ces années d'études, ces hauts et ces bas... Je me force à ne garder à l'esprit que les hauts et les belles choses que tu m'as transmises. Je garde précieusement à mon souvenir ton dynamisme, ta joie de vivre, ton rire, et cette envie d'aller toujours plus loin. Merci d'avoir accompagné ces premières années de fac à Paris, merci de m'avoir donné cette volonté de persévérer. Ta disparition a été ma souffrance et mon fardeau... Mais j'ai ainsi appris à me construire autrement, au final j'en suis sortie plus forte.

Merci à mes amis que j'aime du fond du cœur (Céline, Vanessa, Maéva, Stéphanie, Fripi', Peter, les Sca', Stouf', Pierre...).

Je terminerai cette longue série par un merci très spécial à mon vieux chat et à ses ronrons anti-stress. Magique et sans conséquence pour la santé !!

*A tous ceux qui sont partis trop tôt, trop vite
A mes parents qui ont toujours cru en moi
A leur amour, à leur soutien
A la **V.I.E***

*« Le bonheur est un chien qui traverse une quatre voies
J'essaierai de m'en souvenir jusqu'au bout de mes pas »
Bruno Caliciuri*

RESUME	15
ABSTRACT	16
LISTE DES ABREVIATIONS	17
CHAPITRE I : ETAT DES CONNAISSANCES	19
I. EPILEPSIE, CRISES ET SYNDROMES EPILEPTIQUES	20
1) DEFINITIONS	20
2) CLASSIFICATION INTERNATIONALE DES CRISES D'EPILEPSIE	20
a) Crises généralisées.....	20
b) Crises partielles.....	20
3) CLASSIFICATION INTERNATIONALE DES SYNDROMES EPILEPTIQUES.....	22
a) Epilepsies et syndromes idiopathiques	22
b) Epilepsies et syndromes symptomatiques	22
c) Epilepsies et syndromes cryptogéniques	23
II. TRAITEMENTS DE L'EPILEPSIE	24
1) MEDICAMENTS ANTIEPILEPTIQUES	24
a) Définition	24
b) Mise en place d'un traitement médicamenteux.....	24
c) Modes d'action des antiépileptiques	25
d) Molécules disponibles	27
e) Efficacité et effets indésirables.....	29
f) Arrêt du traitement	29
2) TRAITEMENT DES EPILEPSIES PHARMACORESISTANTES	30
a) Traitement chirurgical.....	30
b) Stimulation du nerf vague	31
c) Régime cétoène	31
III. LE REGIME CETOENE	32
DONNEES CLINIQUES	32
1) HISTORIQUE ET PRESENTATION DU REGIME CETOENE	32
a) Historique du régime cétoène	32
b) Le régime cétoène	33
2) EQUIVALENTS DU REGIME CETOENE	33
a) Régime cétoène modifié	33

b) Formulation liquide.....	35
c) Régime modifié d'Atkins.....	35
3) EFFICACITE DU REGIME CETOGENE ET DU REGIME MODIFIE D'ATKINS	35
a) Etudes prouvant l'efficacité du régime cétogène	36
b) Efficacité chez l'adolescent et l'adulte.....	37
c) Efficacité du régime modifié d'Atkins.....	38
d) Délai d'efficacité et efficacité à long terme.....	39
e) Marqueurs d'efficacité	39
f) Efficacité par syndrome épileptique	39
4) TOLERANCE ET EFFETS SECONDAIRES	41
a) Tolérance et mesures pour améliorer la tolérance.....	41
b) Effets secondaires.....	42
c) Interactions médicamenteuses et anesthésie générale	43
5) JEUNE INITIAL.....	43
6) MODIFICATIONS DES ANTIEPILEPTIQUES.....	44
7) REGIME CETOGENE : QUELLES QUESTIONS, QUELLES ETUDES CLINIQUES.....	44
DONNEES EXPERIMENTALES.....	45
1) EFFICACITE DU REGIME CETOGENE CHEZ LE RAT	45
a) Modèles expérimentaux : modèles au PTZ.....	45
b) Modèles expérimentaux : crises épileptiques induites chimiquement.....	47
c) Modèles expérimentaux : crises épileptiques induites par des chocs électriques	47
d) Modèles expérimentaux : crises épileptiques induites par des stimuli sonores	49
e) Modèles expérimentaux : prévention de la récurrence des crises épileptiques dans les modèles de kindling électrique et d'état de mal épileptique	49
2) EFFICACITE DU REGIME CETOGENE CHEZ LA SOURIS.....	50
a) Modèles expérimentaux : seuil au PTZ et crises épileptiques induites chimiquement	50
b) Modèles expérimentaux : crises épileptiques induites par des chocs électriques	51
c) Modèles expérimentaux : souris EL Mice.....	52
d) Modèles expérimentaux : souris génétiquement modifiées	53
3) EFFICACITE GLOBALE DU REGIME CETOGENE CHEZ LE RONGEUR	54
MECANISMES D'ACTION DU REGIME CETOGENE	55
1) ROLE DES CORPS CETONIQUES	55
a) Acétone.....	55
b) Acétoacétate	57
c) Bêta hydroxybutyrate	57
2) MODULATION DE LA NEUROTRANSMISSION	58
a) Noradrénaline.....	58
b) Glutamate et aspartate.....	59

c) GABA	60
3) CHANGEMENT DE METABOLISME ENERGETIQUE.....	62
a) Effet de l'inhibition de la glycolyse	62
b) Modifications du métabolisme énergétique.....	63
4) ACTIONS NEUROPROTECTRICES DU REGIME CETOGENE.....	64
a) Modulation de la mort cellulaire et de la neurogenèse.....	64
b) Action sur le stress oxydant	65
5) ROLE DES ACIDES GRAS POLY-INSATURES	66
IV. ACIDES GRAS POLY-INSATURES	67
1) GENERALITES SUR LES ACIDES GRAS POLY-INSATURES	67
2) L'ACIDE LINOLEIQUE (LA) ET L'ACIDE ALPHA LINOLENIQUE (ALA).....	67
3) L'ACIDE ARACHIDONIQUE (AA) ET SES METABOLITES	68
4) L'ACIDE EICOSAPENTAENOÏQUE (EPA) ET SES METABOLITES	69
5) L'ACIDE DOCOSOHXAENOÏQUE (DHA) ET SES METABOLITES.....	69
DONNEES CLINIQUES	70
1) ETUDES CLINIQUES	70
2) COMPARAISON AVEC LES APPORTS DU REGIME CETOGENE.....	71
DONNEES EXPERIMENTALES.....	72
1) EVALUATION <i>IN VITRO</i>	72
2) EVALUATION <i>IN VIVO</i>	73
MECANISMES PORTANT LES PROPRIETES ANTICONVULSIVANTES DES AGPI.....	74
1) MODULATION DE LA FLUIDITE MEMBRANAIRE	75
2) MODULATION DES CANAUX IONIQUES	76
a) Canaux sodiques et calciques	76
b) Canaux potassiques.....	77
3) MODULATION DE L'INFLAMMATION.....	78
4) LES RECEPTEURS PPAR-ALPHA (PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR-ALPHA).....	79
a) Structure des récepteurs PPARs	80
b) Agonistes des récepteurs PPAR-alpha.....	80
c) PPAR-alpha activés et régulations.....	81
<u>CHAPITRE II : HYPOTHESES DE TRAVAIL.....</u>	<u>84</u>
<u>CHAPITRE III : MODELISATION ANIMALE.....</u>	<u>87</u>
I. ETAT DE MAL EPILEPTIQUE : MODELE LITHIUM-PILOCARPINE	88
1) PRESENTATION DU MODELE.....	88
a) Action de la pilocarpine sur les récepteurs muscariniques	88

b) Rôle du lithium	88
2) ETAT DE MAL EPILEPTIQUE LITHIUM-PILOCARPINE ET AGE DES ANIMAUX	89
a) Rats adultes	89
b) Cerveau immature.....	90
c) Conséquences à long terme chez les rats adultes.....	90
II. MODELE DE CRISES EPILEPTIQUES INDUITES PAR LE PTZ.....	91
1) LE PENTYLENETETRAZOLE (PTZ).....	91
2) MODES D'ADMINISTRATION	91
a) Injections intrapéritonéales et sous-cutanées	91
b) Perfusion continue intraveineuse	92
3) CARACTERISTIQUES DES CRISES EPILEPTIQUES	92
a) Effet dose-dépendant.....	92
c) Effet de l'âge des animaux et effets à long terme	93
III. CHOIX DES MODELES.....	94
<u>CHAPITRE IV : RESULTATS.....</u>	<u>95</u>
Partie I :	96
Evaluation des propriétés anticonvulsivantes des acides gras poly-insaturés.....	96
I. METHODOLOGIES.....	97
1) ANIMAUX	97
2) TRAITEMENT	97
3) SEUIL AU PTZ.....	98
4) COMPOSITION CORPORELLE	99
5) COMPOSITION EN ACIDES GRAS DU SANG ET DU CERVEAU	100
6) ANALYSES STATISTIQUES	101
II. RESULTATS	102
III. CONCLUSION	109
<u>PUBLICATION 1 :</u>	<u>111</u>
Partie II :	112
Activation des récepteurs nucléaires PPAR-alpha et propriétés anticonvulsivantes	112
I. METHODOLOGIES.....	113
1) ANIMAUX	113
2) TRAITEMENTS	113
3) SEUILS AU PTZ.....	113
4) CHIRURGIE, EEG ET ETAT DE MAL EPILEPTIQUE	114

5) ANALYSES DES PARAMETRES METABOLIQUES	116
6) ANALYSES STATISTIQUES	116
II. RESULTATS	117
III. CONCLUSION	120
<u>PUBLICATION 2 :</u>	<u>121</u>
Partie III :	122
Comparaison de l'efficacité clinique du régime cétogène et du régime modifié d'Atkins, et analyses des concentrations plasmatiques en acides gras	122
I. METHODOLOGIES	123
1) PATIENTS.....	123
2) PROTOCOLE	123
3) ANALYSES DES ACIDES GRAS PLASMATIQUES	124
4) ANALYSES STATISTIQUES	124
II. RESULTATS	125
III. CONCLUSION	134
<u>PUBLICATION 3 :</u>	<u>136</u>
<u>CHAPITRE V : DISCUSSION</u>	<u>137</u>
I. VERS UNE SIMPLIFICATION DU REGIME CETOGENE : LE REGIME MODIFIE D'ATKINS	138
1) EFFICACITE DU REGIME MODIFIE D'ATKINS	138
2) AVANTAGES DU REGIME MODIFIE D'ATKINS.....	139
3) LIMITES DE CETTE ETUDE	139
II. VERS DES ALTERNATIVES AU REGIME CETOGENE	140
1) LES AGPI	140
2) LE FENOFIBRATE	142
III. LES AGPI, UNE ALTERNATIVE AU REGIME CETOGENE.....	143
1) QUANTITE D'AGPI.....	143
2) QUALITE DES AGPI	144
3) MECANISMES D'ACTION DES AGPI	146
IV. MODE D'ACTION DU FENOFIBRATE.....	152
1) MODULATION DE L'INFLAMMATION PAR LES RECEPTEURS PPAR-ALPHA	152
2) MODULATION DU METABOLISME ENERGETIQUE PAR LES RECEPTEURS PPAR-ALPHA	155
<u>CHAPITRE VI : PERSPECTIVES.....</u>	<u>158</u>

I. LE RECEPTEUR PPAR-ALPHA AU CŒUR DU MECANISME ANTICONVULSIVANT ?	160
II. CARACTERISATION DES APPORTS EN AGPI	162
III. MODULATION DE L'INFLAMMATION PAR LES AGPI ET LES RECEPTEURS PPAR-ALPHA	163
<u>ANNEXES : AUTRES PUBLICATIONS</u>	<u>165</u>
<u>BIBLIOGRAPHIE.....</u>	<u>166</u>

Table des figures

Tableaux :

- Page 21 : n°1 : Classification des épilepsies
Page 23 : n°2 : Classification des syndromes épileptiques
Page 28 : n°3 : Molécules antiépileptiques, utilisation et modes d'action
Page 40 : n°4 : Efficacité du régime cétogène par syndrome épileptique et par maladie métabolique ou génétique associée à une épilepsie
Page 48 : n°5 : Synthèse de l'efficacité anticonvulsivante du régime cétogène chez le rat
Page 54 : n°6 : Synthèse de l'efficacité anticonvulsivante du régime cétogène chez la souris
Page 98 : n°7 : Composition des différents régimes en acides gras poly-insaturés
Page 117 : n°8 : Résultats partie II
Page 126 : n°9 : Résultats partie III
Page 125 : n°10 : Résultats partie III
Page 128 : n°11 : Résultats partie III

Figures :

- Page 26 : n°1 : Représentation schématique d'une région synaptique
Page 34 : n°2 : Métabolisme énergétique au cours du régime cétogène
Page 68 : n°3 : Métabolisme des acides gras poly-insaturés oméga-3 et oméga-6
Page 70 : n°4 : Biosynthèse des eicosanoïdes à partir de l'acide arachidonique et de l'acide eicosapentaénoïque
Page 79 : n°5 : Hypothèses d'action des acides gras poly-insaturés
Page 80 : n°6 : Représentation schématique du récepteur nucléaire PPAR-alpha
Page 82 : n°7 : Effets transcriptionnels du récepteur PPAR-alpha activé
Page 83 : n°8 : Effets transrepressionnels du récepteur PPAR-alpha activé
Page 85 : n°9 : Hypothèses d'action du régime cétogène
Page 90 : n°10 : Illustration de tracés EEG dans le modèle lithium-pilocarpine
Page 93 : n°11 : Illustration de tracés EEG dans le modèle au pentylènetétrazole
Page 98 : n°12 : Illustration d'un seuil au PTZ chez un rat Wistar
Page 99 : n°13 : Illustration de l'analyse corporelle par le PIXImus chez un rat
Page 102 : n°14 : Résultats partie I
Page 103 : n°15 : Résultats partie I
Page 105 : n°16 : Résultats partie I
Page 106 : n°17 : Résultats partie I
Page 107 : n°18 : Résultats partie I
Page 108 : n°19 : Résultats partie I
Page 114 : n°20 : Illustration de l'implantation des électrodes chez un rat Wistar
Page 115 : n°21 : Représentation schématique du montage des électrodes
Page 118 : n°22 : Résultats partie II
Page 119 : n°23 : Résultats partie II
Page 127 : n°24 : Résultats partie III
Pages 129 et 130 : n°25 A et B : Résultats partie III
Pages 132 et 133 : n°26 A et B : Résultats partie III
Page 161 : n°27 : Seuils au PTZ chez des souris sauvages et déficientes en récepteur PPAR-alpha

Liste des publications

Articles publiés

(1) Anticonvulsant effects of linolenic acid are unrelated to brain phospholipid cell membrane compositions

N Porta, B Bourgois, C Galabert, C Lecointe, P Cappy, R Bordet, L Vallée, S Auvin
Epilepsia, 2008 in press

(2) Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist, exerts anticonvulsant properties

N Porta, L Vallée, C Lecointe, E Bouchaert, B Staels, R Bordet, S Auvin
Epilepsia 2008, in press

(3) Acides gras poly-insaturés : propriétés et mécanismes anticonvulsivants

N Porta, S Auvin
Médecine et Sciences, 2008 in press

(4) Le régime cétogène et ses variants : certitudes et doutes

N Porta, E Boutry, L Vallée, S Auvin
Accepté sous réserve de modifications, Revue Neurologique française

Articles soumis

(5) Prolonged ketogenic diet induces stroke protection in mice

N Porta, S Auvin, C Lecointe, M Laprais-Pétrault, L Vallée, R Bordet
Soumis à Journal of Neural Transmission

(6) Comparison of seizure reduction and serum fatty acid levels after receiving the ketogenic and modified Atkins diets

N Porta, L Vallée, E Boutry, M Fontaine, A.F Dessein, S Joriot, J.M Cuisset, J.C Cuvellier, S Auvin
Soumis à Epilepsy and Behavior

Communications orales dans des congrès scientifiques internationaux ou nationaux

LPS decrease apoptosis induced by NMDA antagonist in immature rat brain and its consequences

S Auvin, C Lecointe, **N Porta**, R Bordet, L Vallée

Society for Neuroscience Washington DC, 11/2008

Communications affichées dans des congrès scientifiques internationaux ou nationaux publiées sous forme de résumés

Fenofibrate, a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α agonist, increase PTZ threshold in Wistar adult rat

N Porta, S Auvin, C Lecointe, R Bordet, and L Vallée

American Epilepsy Society San Diego, 12/2006

Inflammation in rat pups given febrile seizures enhances long term excitability

S Auvin, **N Porta**, A Nehlig, B Bourgois, R Bordet, and L Vallée

American Epilepsy Society Washington DC, 12/2005

Oral linolenic acid supplementation has anticonvulsive activity comparable to the Ketogenic Diet in rats

S Auvin, B Bourgois, **N Porta**, S Joriot, R Bordet, and L Vallée

American Epilepsy Society Washington DC, 12/2005

Communications affichées dans des congrès scientifiques internationaux ou nationaux sans publication des résumés

Le fenofibrate, un agoniste des récepteurs PPAR- α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) possède des propriétés anticonvulsivantes

N Porta, S Auvin, C Lecointe, R Bordet et L Vallée

Société européenne de Neurologie Pédiatrique, Marseille 05/2008

Fenofibrate, a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α agonist exerts anticonvulsive properties

N Porta, S Auvin, C Lecointe, R Bordet et L Vallée

Société française de pharmacologie et de physiologie Clermont-Ferrand, 04/2008

Le fenofibrate, un agoniste des récepteurs PPAR-alpha (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) possède des propriétés anticonvulsivantes

N Porta, S Auvin, C Lecointe, R Bordet et L Vallée

Société française de Neurologie Lille, 11/2007

Le fénofibrate, un agoniste des récepteurs PPAR [Alpha] (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) augmente le seuil au pentylènetétrazole chez les rats Wistar adultes

N Porta, S Auvin, C Lecointe, R Bordet, et L Vallée

LARC Neurosciences Lille, 12/2006

Résumé

L'épilepsie affecte environ 1 % de la population. Il s'agit d'une maladie où les crises d'épilepsie surviennent de façon spontanée et imprévue. Le traitement de ces crises fait appel à des antiépileptiques/ Mais dans environ 20 à 30 % des cas, les épilepsies ne répondent pas ou peu aux médicaments. Il s'agit alors d'épilepsies pharmacorésistantes. Un des traitements de recours utilisé pour la prise en charge de ces épilepsies est le régime cétogène. Le régime cétogène consiste à apporter une large quantité de lipides, pour une faible quantité de protéines et de glucides. Ce régime possède des propriétés anticonvulsivantes décrites chez l'Homme et le rongeur, mais les mécanismes d'action restent inconnus à ce jour. Plusieurs mécanismes ont été suggérés tels que : les propriétés anticonvulsivantes des corps cétoniques, la modulation de la neurotransmission, la modulation de l'excitabilité cérébrale via la modulation de canaux ioniques tels que les K_{ATP} . L'implication des acides gras poly-insaturés (AGPI) a également été suggérée. Ceux-ci pourraient moduler la fluidité membranaire, l'activité des canaux ioniques ou encore les voies de l'inflammation. Notre hypothèse de travail a été d'explorer des voies supposées être impliquées dans les propriétés anticonvulsivantes du régime cétogène. Nous nous sommes intéressés aux AGPI et à l'activation des récepteurs nucléaires PPAR-alpha (peroxisome proliferator-activated receptor alpha) en comparaison au régime cétogène. Nous avons utilisé un modèle murin d'état de mal épileptique (lithium-pilocarpine) et l'induction de crises épileptiques avec mesure du seuil au pentylènetétrazole.

Dans un premier temps, nous avons administré *per-os*, pendant 4 semaines un mélange d'AGPI contenant 70 % d'oméga-3 et 25 % d'oméga-6 à des rats Wistar. Les animaux ayant reçu le complément alimentaire par des AGPI présentaient une augmentation du seuil au PTZ comparable à celle obtenue chez les animaux ayant reçu un régime cétogène. Les animaux complémentés par les AGPI ou ayant reçu le régime cétogène présentaient des variations plasmatiques en AGPI concernant l'acide arachidonique, l'acide alpha linoléique et l'acide eicosapentaénoïque. Aucune modification du statut nutritionnel ou des phospholipides cérébraux membranaires n'était retrouvée. Dans un second temps, nous avons administré pendant 14 jours de la nourriture contenant 0,2 % de fénofibrate (agoniste des récepteurs PPAR-alpha) à des rats Wistar. Le traitement par 0,2 % de fénofibrate conduisait à augmenter le seuil au PTZ et à retarder le début de l'état de mal épileptique dans le modèle lithium-pilocarpine. Ces résultats étaient comparables à ceux obtenus avec le régime cétogène. En revanche, le traitement associant le régime cétogène et le fénofibrate ne conduisait pas à moduler le seuil au PTZ chez les animaux.

Ces travaux ont permis de montrer que les AGPI ont des propriétés anticonvulsivantes comparables à celles du régime cétogène. Ces propriétés anticonvulsivantes ont également été retrouvées suite à l'activation des récepteurs nucléaires PPAR-alpha par le fénofibrate. Les propriétés anticonvulsivantes portées par les AGPI ne sont pas liées à une variation de la composition des membranes cellulaires cérébrales en phospholipides. Les récepteurs nucléaires PPAR-alpha modulent quant à eux de nombreuses voies (métaboliques, inflammatoires, stress oxydant) via des variations d'expression génique et peuvent être activés par les AGPI. L'implication de ces différentes voies dans l'efficacité anticonvulsivante du fénofibrate reste à explorer. Ces résultats, s'ils sont confirmés par des études complémentaires dans d'autres modèles, laissent penser qu'une simplification du régime cétogène pourrait être envisagée via l'utilisation des AGPI et/ou via l'activation des récepteurs nucléaires PPAR-alpha.

Abstract

Epilepsy affects 1 % of the population. Epilepsy is defined symptomatically by the appearance of spontaneous, recurrent seizures. Conventional treatment of epilepsy consists of anticonvulsant medications. Although these drugs often control or reduce seizure frequency, about 20-30 % of patients show little or no improvement. These patients exert intractable epilepsy. Ketogenic diet a high-fat, low-protein, low-carbohydrate diet that has been employed as a nonpharmacologic therapy for intractable epilepsy. Antiepileptic efficacy has been described in Human and in both acute and chronic rodent models. However, mechanisms underlying its anticonvulsive properties remained unknown. Numerous mechanistic hypotheses have been advanced: anticonvulsive properties of ketone bodies, variation in neurotransmitter concentrations, cellular excitability modulation via K_{ATP} channel, or implication of polyunsaturated fatty acids. Several hypotheses have been suggested to explain the anticonvulsant effects of polyunsaturated fatty acids: modification of the membrane fluidity, direct action of polyunsaturated fatty acids on cell membrane ionic channels and/or receptors, modulation of inflammatory responses. Here, we have work on polyunsaturated fatty acids and PPAR-alpha receptor (peroxisome proliferators-activated receptor alpha) activation in comparison to ketogenic diet, using rodent status epilepticus model (lithium pilocarpine) and rodent pentylentetrazol (PTZ) thresholds.

First one, four week-old male Wistar rats were fed for 30 days by a standard diet with daily oral supplementation by a blend containing 70 % omega-3 and 25 % omega-6 (ALA/LA blend). Animals daily supplemented by ALA/LA blend exhibited an increase in PTZ threshold comparable to those obtain after ketogenic diet. The animals did not show any modification of body composition and brain phospholipid compositions. The plasma fatty acids composition was modified by ketogenic diet and ALA/LA blend. A decrease in arachidonic acid concentrations was observed in both ketogenic diet and ALA/LA supplemented groups, while an increase in eicosapentaenoic and alpha linolenic acid concentrations was only observed in the ALA/LA supplemented group. In second, Wistar rats were fed at libitum during 14 days by standard diet containing 0.2 % fenofibrate (PPAR-alpha agonist). In fenofibrate and ketogenic diet treated animals, both myoclonic and generalized seizure PTZ thresholds were increased. Latencies to the onset of status epilepticus were also increased in these treated animals. Therefore animals treated by fenofibrate and ketogenic diet did not exert changes in both myoclonic and generalized seizure PTZ threshold.

Polyunsaturated fatty acids exert anticonvulsive properties comparable to KD. Same results were found after PPAR-alpha activation by fenofibrate. Anticonvulsive properties of polyunsaturated fatty acids are not associated with change in brain phospholipids composition. Activation of PPAR-alpha can modulate metabolic, inflammatory or oxidative stress pathways and polyunsaturated fatty acids are natural ligands of PPAR-alpha. These pathways remain to explore so as to understand anticonvulsive efficacy of fenofibrate. Further studies are needed in order to conclude if ketogenic diet protocols should be simplified via used of polyunsaturated fatty acids and/or PPAR-alpha activation.

Liste des abréviations

2-DG : 2 déoxyglucose
AA : acide arachidonique
ACA : acétoacétate
ADN : acide désoxyribonucléique
AE : antiépileptique
AG : acides gras
AGPI : acides gras poly-insaturés
ALA : acide alpha linoléique
AMPA : amino-hydroxyl-méthyl-isoaxole-propionique
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ATP : adénosine triphosphates
BHB : bêta hydroxybutyrate
COX : cyclo-oxygénase
DCI : dénomination commune internationale
DHA : acide docosohexaénoïque
EAAC1 : transporteur neuronal du glutamate
EEG : électro-encéphalogramme
EPA : acide eicosapentaénoïque
esm : écart standard à la moyenne
F16BP : fructose 1-6 biphosphate
GABA : acide gamma amino-butyrique
GABA_A : récepteur ionotropique au GABA
GABA-T : GABA transaminase
GAD : glutamate décarboxylase
GAT : transporteur du GABA
GBL : gamma butyrolactone
GLA : acide gamma linoléique
GLAST : transporteur glutamate-aspartate
GLT1 : transporteur glial du glutamate
Glu : glutamate
Glu-R : récepteurs ionotropiques au glutamate
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
HD : canaux haut voltage-dépendant
i.c.v. : intracérébroventriculaire
IL : interleukine (IL1, IL6...)
i.m. : intramusculaire
iNOS : NO synthase inductible

i.p. : intrapéritonéale
i.v. : intraveineux
KO : knock-out
LA : acide linoléique
LCT : triglycérides à long chaîne
LOX : lipo-oxygénase
LPS : lipopolysaccharide
LT : leucotriènes (LTB4, LTB5....)
MCT : triglycérides à moyenne chaîne
mHS : 3-hydroxyl-3-methylglutharyl-CoA
n-3 : oméga-3
n-6 : oméga-6
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
MMP : métalloprotéinases
NFkB : facteur nucléaire Kb
NFkB-RE : élément de réponse au facteur nucléaire Kb
PC : phosphatidylcholine
PE : phosphatidylethanolamine
PG : prostaglandines (PGE2, PGE3....)
PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE : élément de réponse aux récepteurs PPAR
PTZ : pentylènetétrazole
RXR : récepteur à l'acide rétinoïque
s.c. : sous cutané
SSADH : succinic semialdehyde dehydrogenase
TNF-alpha : facteur nécrosant de tumeur (alpha)
UCP : uncoupling protein
VD : canaux voltage-dépendant

Chapitre I : état des connaissances

ETAT DES CONNAISSANCES

I. Epilepsie, crises et syndromes épileptiques

Du grec epilêpsia, du verbe epilambanein (saisir, attaquer par surprise).....

1) Définitions

L'épilepsie est une affection neurologique qui affecte environ 1 % de la population (Picot et al., 2008). La maladie épileptique, ou épilepsie au sens large, se caractérise par la répétition, chez un même sujet, de crises épileptiques spontanées.

Les crises épileptiques sont l'expression de la décharge anormale et hypersynchrone de tout ou une partie des neurones corticaux. Les crises épileptiques sont caractérisées par des manifestations cliniques (motrices, sensorielles, sensitives, psychiques, végétatives) et par des manifestations électro-encéphalographiques. Les manifestations cliniques diffèrent en fonction des régions cérébrales impliquées. Les crises d'épilepsie peuvent être généralisées, partielles ou secondairement généralisées.

2) Classification internationale des crises d'épilepsie

Les crises épileptiques généralisées et partielles sont répertoriées selon une classification internationale (Tableau 1) adoptée en 1981 (ILAE, 1981).

a) Crises généralisées

Les crises d'épilepsie sont généralisées quand la décharge épileptique affecte tous les neurones corticaux. Le cortex cérébral est affecté de façon bilatérale, synchrone et symétrique. Différents symptômes peuvent être observés mais ils ne permettent pas d'établir de lien anatomo-clinique.

b) Crises partielles

Les crises épileptiques sont partielles quand la décharge neuronale affecte un nombre limité de neurones corticaux (zone épileptogène). Cette décharge est focalisée et

unilatérale. Les symptômes observés pendant la crise épileptique partielle sont étroitement liés aux régions cérébrales recrutées par la décharge neuronale.

La décharge épileptique initialement focalisée peut se propager à d'autres régions corticales, où à l'ensemble des neurones corticaux. Dans ce dernier cas, la crise d'épilepsie initialement partielle est secondairement généralisée.

Les crises épileptiques partielles sont dites simples quand il n'y a pas de rupture de la conscience, et, elles sont dites complexes en cas d'altération de celle-ci.

c) Crises inclassables

Certaines crises épileptiques demeurent inclassables car elles ne répondent pas aux critères définis.

Tableau 1 : Classification des crises épileptiques (ILAE, 1981).

Crises GENERALISEES	Crises PARTIELLES	Crises INCLASSABLES
Absences typiques		
Absences atypiques	Partielles simples	
Crises myocloniques		
Crises cloniques	Partielles complexes	
Crises toniques		
Crises tonico-cloniques	Partielles secondairement généralisées	
Crises atoniques		

3) Classification internationale des syndromes épileptiques

En 1989, une seconde classification a été publiée (ILAE, 1989). Dans cette seconde classification, présentée dans le tableau 2, les syndromes épileptiques sont décrits plus précisément. Le syndrome épileptique se caractérise par le « groupement d'un certain nombre de symptômes et signes, apparaissant ensemble de manière constante et non fortuite » (ILAE, 1989). Cette classification repose sur les caractères electro-cliniques des crises, sur la nature de celles-ci (généralisée ou partielle), mais aussi sur d'autres facteurs tels que l'âge de survenue ou la cause, permettant de distinguer les épilepsies idiopathiques, symptomatiques et cryptogéniques. Une telle classification permet d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients et d'appréhender le pronostic.

a) Epilepsies et syndromes idiopathiques

Les crises surviennent indépendamment de toute lésion cérébrale structurale décelable par imagerie ou analyses anatomiques. Ces perturbations semblent liées à l'existence d'une prédisposition génétique, et elles se manifestent au cours de phases précises de la maturation cérébrale. Ces syndromes apparaissent à un âge spécifique et disparaissent spontanément après quelques années. Les crises épileptiques ne se modifient pas et ne s'aggravent pas avec leur répétition.

b) Epilepsies et syndromes symptomatiques

Ces épilepsies résultent d'une lésion structurale diffuse ou focale, évolutive ou fixée du système nerveux central. Cette lésion cérébrale peut être anténatale ou postnatale, et elle est acquise ou développementale. La mise en évidence de ces anomalies structurales peut se faire par des examens neuroradiologiques mais aussi par des analyses anatomopathologiques. La lésion cérébrale participe à la réorganisation des réseaux synaptiques, ce qui contribue à la genèse des crises épileptiques. Ces syndromes épileptiques apparaissent indépendamment de l'âge. Ils ne régressent pas spontanément, et la répétition des crises épileptiques favorise l'aggravation.

c) Epilepsies et syndromes cryptogéniques

Le terme cryptogénique signifie que la cause demeure cachée. Dans ces épilepsies, la lésion est suspectée mais elle ne peut pas être mise en évidence par les techniques actuelles d'imagerie.

Tableau 2 : Classification des syndromes épileptiques (ILAE, 1989).

<p>Epilepsies et syndromes épileptiques focaux</p> <p><u>Idiopathiques, liés à l'âge</u> Epilepsie bénigne de l'enfance à paroxysmes rolandiques Epilepsie bénigne de l'enfance à paroxysmes occipitaux</p> <p><u>Symptomatiques</u> Syndrome de Kojewnikov ou épilepsie partielle continue Epilepsies lobaires (temporal, frontal, pariétal, occipital)</p> <p><u>Cryptogéniques</u></p> <p>Epilepsies et syndromes épileptiques généralisés</p> <p><u>Idiopathiques, liés à l'âge avec par ordre chronologique</u> Convulsions néonatales familiales bénignes Convulsions néonatales bénignes Epilepsie-absence de l'enfance Epilepsie-absence de l'adolescence Epilepsie myoclonique juvénile Epilepsie à crises Grand Mal du réveil Epilepsies à crises précipitées par certaines modalités spécifiques</p> <p><u>Cryptogéniques ou Symptomatiques</u> Spasmes infantiles (Syndrome de West) Syndrome de Lennox-Gastaut Epilepsie avec crises myoclonico-astatiques (syndrome de Doose) Epilepsie avec absences myocloniques</p> <p><u>Symptomatiques</u> Sans étiologie spécifique Encéphalopathie myoclonique précoce Encéphalopathie infantile précoce avec suppression-bursts</p> <p>Autres Syndromes spécifiques (de nombreuses étiologies métaboliques ou dégénératives peuvent entrer dans cette classe)</p> <p>Epilepsie dont le caractère focal ou généralisé n'est pas déterminé</p> <p><u>Avec association de crises généralisées et partielles</u> Crises néonatales Epilepsie myoclonique sévère Epilepsie avec pointes ondes continues pendant le sommeil lent Epilepsie avec aphasia acquise (syndrome de Landau-Kleffner)</p> <p><u>Sans caractères généralisés ou focaux certains</u></p> <p>Syndromes spéciaux</p> <p><u>Crises occasionnelles, liées à une situation épileptogène transitoire</u> Convulsions fébriles Crise uniquement précipitée par un facteur toxique ou métabolique</p> <p><u>Crise isolée, état de mal épileptique isolé</u></p>

II. Traitements de l'épilepsie

Les syndromes épileptiques sont le plus souvent pris en charge par un traitement médicamenteux qui module l'excitabilité cérébrale en agissant au niveau de la neurotransmission (synthèse, libération, recapture des neurotransmetteurs) sur des canaux ioniques et/ou sur des récepteurs ionophores. Malheureusement, 20 à 30 % des épilepsies ne répondent pas à ces agents (Picot et al., 2008; Sander, 1993). Ces épilepsies sont dites pharmacorésistantes. Elles peuvent être prises en charge par la chirurgie, la stimulation du nerf vague ou encore par la mise en place d'un régime cétogène. Chacune de ces stratégies pose le problème de la limitation des indications, des effets indésirables et/ou des contraintes dans la vie quotidienne (Wilong, 2007).

1) Médicaments antiépileptiques

En première intention les épilepsies sont prises en charge par des médicaments dits antiépileptiques qui ne sont pas dénués d'effets secondaires. Cette prise en charge thérapeutique a des limites car certains patients ne répondent pas aux molécules actuellement disponibles.

a) Définition

Les antiépileptiques permettent un traitement symptomatique des crises d'épilepsie. Ils n'ont pas de propriétés curatives. La mise en place d'un traitement antiépileptique a pour but de diminuer la fréquence et/ou la sévérité des crises d'épilepsie. Un tel traitement contribue à prévenir l'apparition des crises d'épilepsie et à maintenir une vie sociale proche de la normale pour le patient. La mise en place d'un traitement antiépileptique n'est pas dénuée de conséquences (effets secondaires, aggravation de l'épilepsie).

b) Mise en place d'un traitement médicamenteux

Le traitement de première intention est une monothérapie. Après deux essais de monothérapie sans succès, une bithérapie puis une polythérapie peuvent être envisagées. Le choix de la molécule utilisée repose sur le type de crises d'épilepsie développées par le patient, le syndrome épileptique, la personnalité et l'état psychique du patient. Le

médicament est introduit selon une posologie progressive. La continuité du traitement antiépileptique est indispensable.

c) Modes d'action des antiépileptiques

Les antiépileptiques peuvent moduler la fonction des canaux ioniques et/ou des récepteurs membranaires, mais ils peuvent également moduler la biodisponibilité des principaux neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs cérébraux (Landmark, 2007; Stefan and Feuerstein, 2007). Les mécanismes d'action des antiépileptiques sont variés, une molécule donnée peut agir de plusieurs façons et certains mécanismes d'action sont encore inconnus. Les principaux sites d'action des antiépileptiques sont repris dans le tableau 3 et une illustration des sites d'action est proposée dans la figure 1.

➤ Actions sur les canaux ioniques

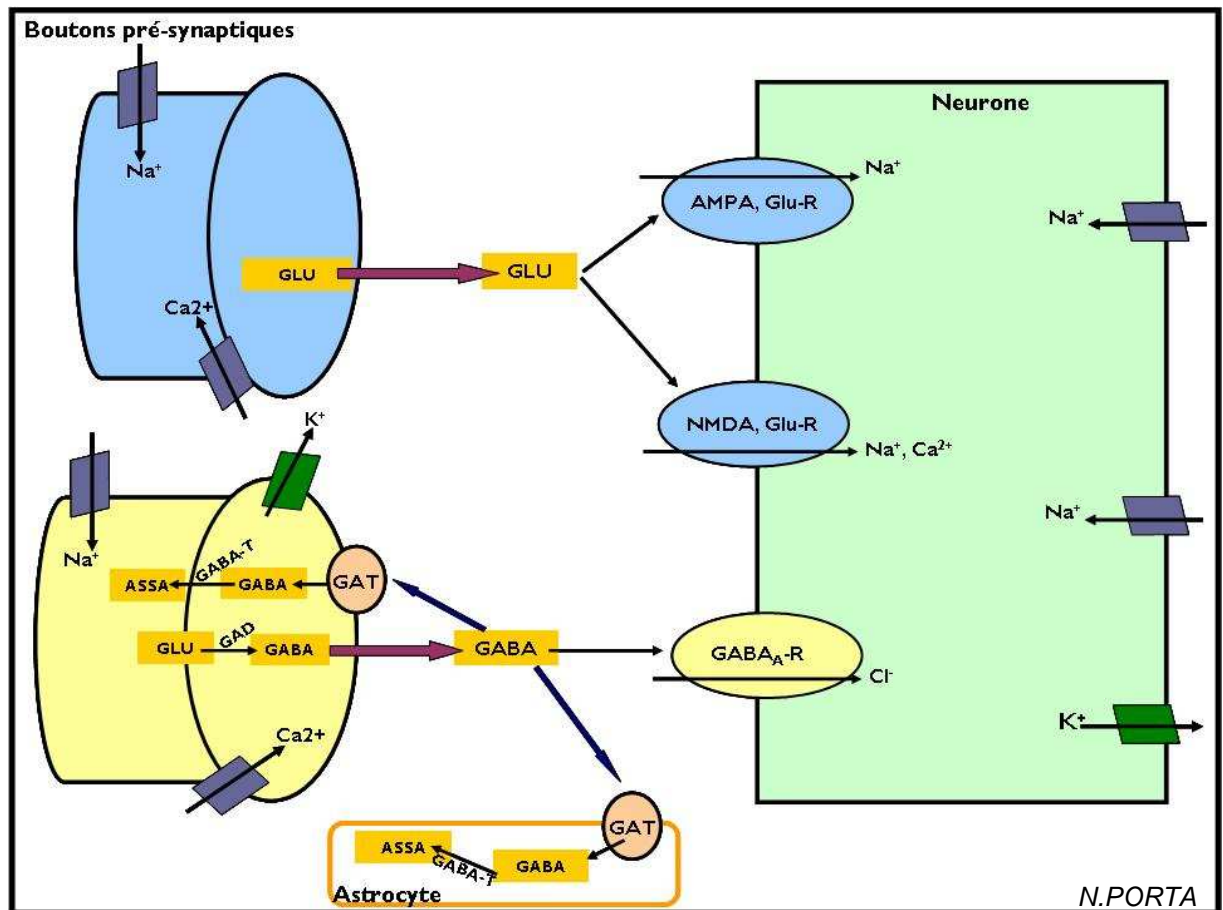
Les antiépileptiques peuvent agir en inhibant ou en réduisant les flux ioniques des canaux voltage-dépendant sodiques et calciques (de type T et activés par de hauts voltages). Cela empêche la dépolarisation cellulaire via les mouvements ioniques et/ou la libération des neurotransmetteurs. Ces mécanismes contribuent à diminuer l'excitabilité cellulaire et à bloquer la transmission de l'influx nerveux.

➤ Actions sur les récepteurs membranaires post-synaptiques

Les antiépileptiques peuvent agir sur les récepteurs ionophores au GABA et au glutamate situés dans la région post-synaptique. Les agonistes des récepteurs GABA_A favorisent une hyperpolarisation cellulaire locale via l'augmentation de la fréquence et/ou de la durée d'ouverture des canaux aux ions chlores. Tandis que les antagonistes des récepteurs au glutamate (NMDA et AMPA) empêchent la dépolarisation cellulaire locale en bloquant l'ouverture des canaux associés à ces récepteurs (canaux calciques et/ou sodiques).

Figure 1: Représentation schématique d'une région synaptique, avec la transmission excitatrice de type glutamatergique (en bleue) et inhibitrice de type GABAergique (en jaune). Sont représentées sur la figure une synapse libérant du glutamate (GLU) qui peut aller agir sur les récepteurs canaux (Glu-R) de type AMPA et NMDA, et sur les récepteurs métabotropiques (non représentés ici), ainsi qu'une synapse libérant de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) pouvant agir sur le récepteur canal GABA_A-R, et sur son récepteur métabotropique (non représenté ici).

ASSA : acide succinyl-semi-aldehyde ; GAT : transporteur du GABA ; GAD : glutamate décarboxylase ; GABA-T : GABA transaminase ; AMPA : amino-hydroxyl-méthyl-isoazole-propionique ; NMDA : N-méthyl-D-aspartate.



➤ Actions sur la biodisponibilité des neurotransmetteurs

Les antiépileptiques contribuent aussi à moduler la biodisponibilité des neurotransmetteurs tels que le GABA et le glutamate. Ils peuvent ainsi favoriser l'inhibition portée par le système GABA en bloquant la recapture du GABA, en bloquant la dégradation du GABA dans les astrocytes et dans la région pré-synaptique, et en favorisant la synthèse de GABA en agissant sur l'enzyme glutamate décarboxylase (GAD). L'inhibition peut également être renforcée par une action inhibitrice sur le système excitateur avec par exemple une inhibition de la libération du glutamate au niveau pré-synaptique.

d) Molécules disponibles

Il existe une grande variété de molécules ayant une action antiépileptique. Elles sont commercialisées sous différentes formes : orales, injectables, à libération prolongée, en suppositoire. Ces molécules, leurs dates de mise sur le marché, leurs utilisations ainsi que leurs modes d'action sont repris dans le tableau 3.

Le phénobarbital, la phénytoïne, la carbamazépine et le valproate sont des molécules de première génération. De nouvelles molécules (felbamate, gabapentine, lamotrigine, topiramate, tigabine, vigabatrin, ...) ont été développées plus récemment et elles sont mieux tolérées par les patients. Elles respectent les fonctions cognitives et les interactions médicamenteuses sont moins marquées par rapport aux antiépileptiques de première génération. D'autres molécules ont montré leurs efficacités antiépileptiques dans des conditions bien précises. Certaines encéphalopathies épileptogènes de l'enfant peuvent être prises en charge par des corticoïdes, il en est de même pour les syndromes de West et de Landau-Kleffner. Les immunoglobulines humaines peuvent être utiles dans la prise en charge de l'encéphalite de Rasmussen. L'acétazolamide (Diamox), un inhibiteur de l'anhydrase carbonique est utilisé comme médicament d'appoint dans la prise en charge des absences et comme adjuvant de la carbamazépine dans certaines épilepsies partielles rebelles.

Tableau 3 : Molécules antiépileptiques, utilisation et modes d'action. La liste des noms commerciaux n'est pas exhaustive. [DCI : dénomination commune internationale ; VD : voltage-dépendant ; HV : haut voltage ; GAT : transporteur du GABA ; GAD : glutamate décarboxylase ; GABA-T : GABA transaminase]. Tableau réalisé à partir des références suivantes (Bialer et al., 2002;Landmark, 2007;Stefan and Feuerstein, 2007).

DCI	Nom commercial	Année de mise sur le marché en France	Utilisation	Cibles
Benzodiazépines	Urbanyl Rivotril Valium, Mogadon	1972 1970 1964	épilepsies : partielles, généralisées syndromes de Lennox-Gastaut, EME	récepteurs GABA _A
Carbamazépine	Tegretol	1964	épilepsies : généralisées, partielles, pas d'effet sur les absences et les myoclonies	canaux VD Na ⁺
Ethosuximide	Zarontin	1962	Absences	canaux VD Ca ²⁺ de type T
Felbamate	Taloxa	1994	syndrome Lennox-Gastaut	canaux VD Na ⁺ , canaux HV Ca ²⁺ récepteurs GABA _A et NMDA
Gabapentine	Neurontin	1995	épilepsies : partielles +/- généralisation secondaire, généralisées	GAD, canaux HV Ca ²⁺
Hydantoïne	Di-Hydan, Dilantin Prodilantin	1941 1941	épilepsies : généralisées, partielles, EME, pas d'effet sur les absences et les myoclonies	canaux VD Na ⁺
Lévétiracétam	Keppra	2002	épilepsies : partielles +/- généralisation secondaire, généralisées, absences et myoclonies	canaux HV Ca ²⁺ , inhibition de la libération de glutamate
Lamotrigine	Lamictal	1996	épilepsies : partielles, généralisées, absences	canaux VD Na ⁺ , canaux HV Ca ²⁺ , inhibition de la libération de glutamate
Oxcarbazépine	Trileptal	2000	épilepsies généralisées, partielles, pas d'effet sur les absences et les myoclonies	canaux VD Na ⁺ , canaux VD Ca ²⁺
Phénobarbital	Gardéнал, Alepsal	1920	épilepsies : partielles, généralisées et EME pas d'efficacité sur absences et myoclonies	récepteurs GABA _A et AMPA canaux HV Ca ²⁺
Pregabaline	Lyrica	2004	épilepsies : partielles +/- généralisation secondaire, généralisées	GAD, canaux HV Ca ²⁺
Tigabine	Gabitril	1997	épilepsies : partielles +/- généralisation secondaire, généralisées	GAT
Topiramate	Epitomax	1998	épilepsies : partielles, généralisées, absences et myoclonies syndromes de West et de Lennox-Gastaut	canaux VD Na ⁺ , canaux HV Ca ²⁺ , récepteurs AMPA et GABA _A
Valproate	Depakine	1967	large spectre sauf pour syndrome de West	GAD, GABA-T, antagoniste du glutamate canaux VD Na ⁺
Vigabatrin	Sabril	1991	épilepsies : partielles, généralisées, syndromes de West et de Lennox-Gastaut	GABA-T
Zonisamide	Zonegran	2002	épilepsies : partielles, généralisées, absences, myoclonies syndromes de West et de Lennox-Gastaut	canaux VD Na ⁺ , canaux VD Ca ²⁺ de type T

e) Efficacité et effets indésirables

Un traitement antiépileptique peut être jugé inefficace si des crises épileptiques continuent de survenir malgré un traitement bien suivi. Dans le cadre des polythérapies, si cela est possible, un dosage sérique des molécules utilisées est recommandé avant de conclure à l'inefficacité du traitement. Si le taux plasmatique recommandé est associé à une récurrence des crises, la posologie peut être augmentée jusqu'à obtenir une concentration plasmatique à la limite de l'apparition des effets indésirables. Si dans ce nouveau contexte l'inefficacité est toujours avérée alors, un changement d'une ou de plusieurs molécules peut être envisagé.

Les traitements antiépileptiques peuvent conduire à l'apparition d'effets indésirables chez les patients. Ces effets sont :

- neurosensoriels : somnolence, vertiges, ataxie, nystagmus, diplopie, céphalées, dépression
- cognitifs : troubles de la mémoire et de l'apprentissage
- digestifs : nausées, vomissements, gastralgie, anorexie, prise de poids, hyperplasie des gencives
- hématologiques : leucopénie, thrombopénie, anémie, agranulocytose
- dermatologiques : éruptions cutanées, pigmentations
- réaction d'hypersensibilité : éosinophilie, arthralgie, hépatite

Certains antiépileptiques sont des inducteurs enzymatiques (phénytoïne, carbamazépine, phénobarbital) tandis que d'autres sont des inhibiteurs enzymatiques (valproate, felbamate). Il est donc nécessaire d'en tenir compte dans le cadre d'association médicamenteuse. L'utilisation du felbamate et du vigabatrin nécessite un suivi étroit des patients car des effets indésirables sévères sont décrits lors de l'utilisation de ces deux molécules. Un traitement par du vigabatrin peut conduire à une atteinte rétinienne avec un rétrécissement du champ visuel, tandis que le felbamate peut induire une aplasie médullaire, des insuffisances hépatiques aiguës et des accidents d'hypersensibilisation.

f) Arrêt du traitement

Un traitement antiépileptique doit être réévalué périodiquement. Les diminutions de traitements sont toujours progressives. Après deux ans sans crise épileptique, une diminution puis un arrêt du traitement peut être envisagé. L'arrêt d'un traitement antiépileptique se fait

progressivement. Les récurrences surviennent le plus souvent dans la première année suivant l'arrêt du traitement. Les arrêts de traitement sont facilités dans le cadre des épilepsies avec un seul type de crise, des crises épileptiques généralisées et des épilepsies facilement contrôlées par la première monothérapie.

Chez les patients traités par une polythérapie, si l'épilepsie est bien contrôlée, le nombre de médicaments peut être progressivement diminué en commençant par supprimer les médicaments dont les effets positifs ont été les moins flagrants au cours de la prise en charge thérapeutique.

Dans certains cas, l'arrêt des traitements antiépileptiques est difficilement envisageable. C'est le cas pour les épilepsies lésionnelles, les épilepsies partielles d'équilibre difficile ou encore pour les épilepsies myocloniques juvéniles.

2) Traitement des épilepsies pharmacorésistantes

Dans le cadre des épilepsies pharmacorésistantes, des prises en charge thérapeutiques non médicamenteuses sont possibles : traitement chirurgical, stimulation du nerf vague, régime cétoène. Ces alternatives seront succinctement abordées dans cette partie.

a) Traitement chirurgical

La prise en charge chirurgicale des épilepsies peut être indiquée chez les patients présentant des épilepsies pharmacorésistantes. Elle est souvent pratiquée chez les jeunes patients, et dans certains cas une prise en charge chirurgicale précoce peut conduire à limiter l'évolution spontanée et catastrophique de certains syndromes épileptiques infantiles (syndrome de Sturge-Webber, hémimégalencéphalie, encéphalite de Rasmussen). Mais cette prise en charge est hautement spécifique, et pour être éligibles, les patients doivent présenter une zone épileptogène et/ou lésionnelle bien définie, qui n'affecte pas les zones cérébrales hautement fonctionnelles. Avant de décider de la possibilité de la prise en charge chirurgicale, les patients sont évalués par imagerie et imagerie fonctionnelle, par enregistrements électro-encéphalographiques ou stéréo-electro-encéphalographiques, ils sont également évalués sur le plan psychologique et neuropsychologique.

La procédure chirurgicale peut être palliative ou curative. La prise en charge palliative ne conduit pas à une guérison, mais la vie du patient peut être améliorée. Le but de cette intervention est d'interrompre les voies de connexions entre les deux hémisphères cérébraux de façon à empêcher la bilatéralisation des décharges. Il peut s'agir d'une callostomie ou d'une hémisphérotomie. Cette procédure est particulièrement indiquée dans le cadre des épilepsies partielles et généralisées pharmacorésistantes qui provoquent des chutes brutales et traumatisantes chez les patients. La prise en charge curative se fait par cortectomie. Cette prise en charge se fait chez des patients présentant une épilepsie ne répondant pas au traitement médicamenteux depuis au moins deux ans. L'ablation de la zone épileptogène ne doit pas provoquer d'importants déficits neurologiques ou neuropsychologiques.

Le traitement antiépileptique est maintenu au moins deux ans après l'intervention chirurgicale. Si les crises épileptiques disparaissent alors, il est possible de diminuer progressivement la médication. Un patient sera considéré comme guéri s'il ne présente pas de crises épileptiques 5 ans après l'intervention.

b) Stimulation du nerf vague

La stimulation chronique intermittente du nerf vague consiste à stimuler électriquement le nerf X gauche via une électrode implantée et connectée à un stimulateur qui est placé sous la peau. L'indication d'un tel traitement se fait dans le cadre des épilepsies pharmacorésistantes dont la prise en charge chirurgicale s'est avérée impossible ou inefficace. A ce jour, les mécanismes conduisant au contrôle de la fréquence des crises épileptiques sont inconnus.

c) Régime cétogène

La prise en charge des épilepsies pharmacorésistantes peut se faire par le régime cétogène. Ce régime apporte une grande quantité de lipides pour de faibles quantités en protéines et glucides. Les patients présentent une cétose urinaire et plasmatique après quelques jours, et les effets sur la fréquence des crises peuvent survenir de quelques jours après l'initiation du régime jusqu'à deux mois après (Kossoff et al., 2008a). Dans cette étude, 84 % des patients présentaient une diminution de la fréquence des crises épileptiques et chez 75 % des patients cette diminution apparaissait après 14 jours de traitement. Une présentation plus complète du régime cétogène et de ses variants est réalisée dans la partie suivante.

III. Le régime cétogène

Le régime cétogène est utilisé dans la prise en charge thérapeutique des épilepsies pharmacorésistantes. Cependant les mécanismes d'action ne sont pas connus. Seules des hypothèses d'action ont été évoquées par les différentes études menées en clinique mais aussi chez le rongeur.

DONNEES CLINIQUES

1) Historique et présentation du régime cétogène

Dans cette partie nous présenterons brièvement les origines historiques du régime cétogène, ainsi que les changements du métabolisme énergétique associés à un tel régime alimentaire.

a) Historique du régime cétogène

Après avoir observé une baisse du nombre de crises d'épilepsie chez les patients à jeun, les praticiens de la clinique Mayo ont fait l'hypothèse qu'il existait une relation de cause à effet. Ils ont développé un régime riche en lipides, et pauvre en protéides et glucides afin de mimer les effets du jeûne en induisant une cétose (Peterman, 1925; Wilder, 1921). En 1930, Talbot développa un protocole de régime cétogène proche de celui utilisé aujourd'hui : une période de jeûne suivie de la mise en place progressive d'un régime cétogène de ratio 4/1 (lipides versus protéides + glucides) en association avec une restriction hydrique (Talbot, 1930). Ce régime a largement été utilisé jusqu'en 1938, date à laquelle la phénytoïne a été découverte. A cette date, l'attention des médecins et des chercheurs s'est davantage orientée vers le développement de nouveaux agents antiépileptiques médicamenteux. Le régime cétogène est revenu sur le devant de la scène aux USA grâce au producteur Jim Abrahams et son fils Charlie. Charlie atteint d'une épilepsie pharmacorésistante a été traité avec succès par le régime cétogène à l'hôpital Johns Hopkins de Baltimore. Son père a créé la fondation Charlie qui a promu le régime cétogène à travers des ouvrages et un téléfilm pour la chaîne NBC. Outre cet aspect médiatique, le régime cétogène est redevenu un centre d'intérêt depuis

le début des années 1990 du fait des limitations thérapeutiques dans les épilepsies pharmacorésistantes.

b) Le régime cétogène

Le régime cétogène induit une cétose par son contenu riche en lipides et pauvre en glucides et protides. Il apporte assez de protides pour assurer la croissance. Le métabolisme énergétique est dérivé de la voie de l'oxydation des acides gras au niveau mitochondrial. Etant donné les grandes quantités d'acides gras oxydés dans les mitochondries hépatiques, de l'acétyl-CoA est largement libéré. L'efficacité du cycle de Krebs diminue (Hartman et al., 2007). La production des corps cétoniques est alors induite (acétoacétate, acétone et bêta hydroxybutyrate). Les corps cétoniques peuvent être utilisés comme source d'énergie par les organes extra hépatiques. Ils ont également la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique permettant leur utilisation au niveau cérébral (Morris, 2005). Au niveau cérébral, les corps cétoniques sont convertis en acétyl-CoA dans les mitochondries conduisant à la production d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) via le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire mitochondriale (Figure 2).

2) Equivalents du régime cétogène

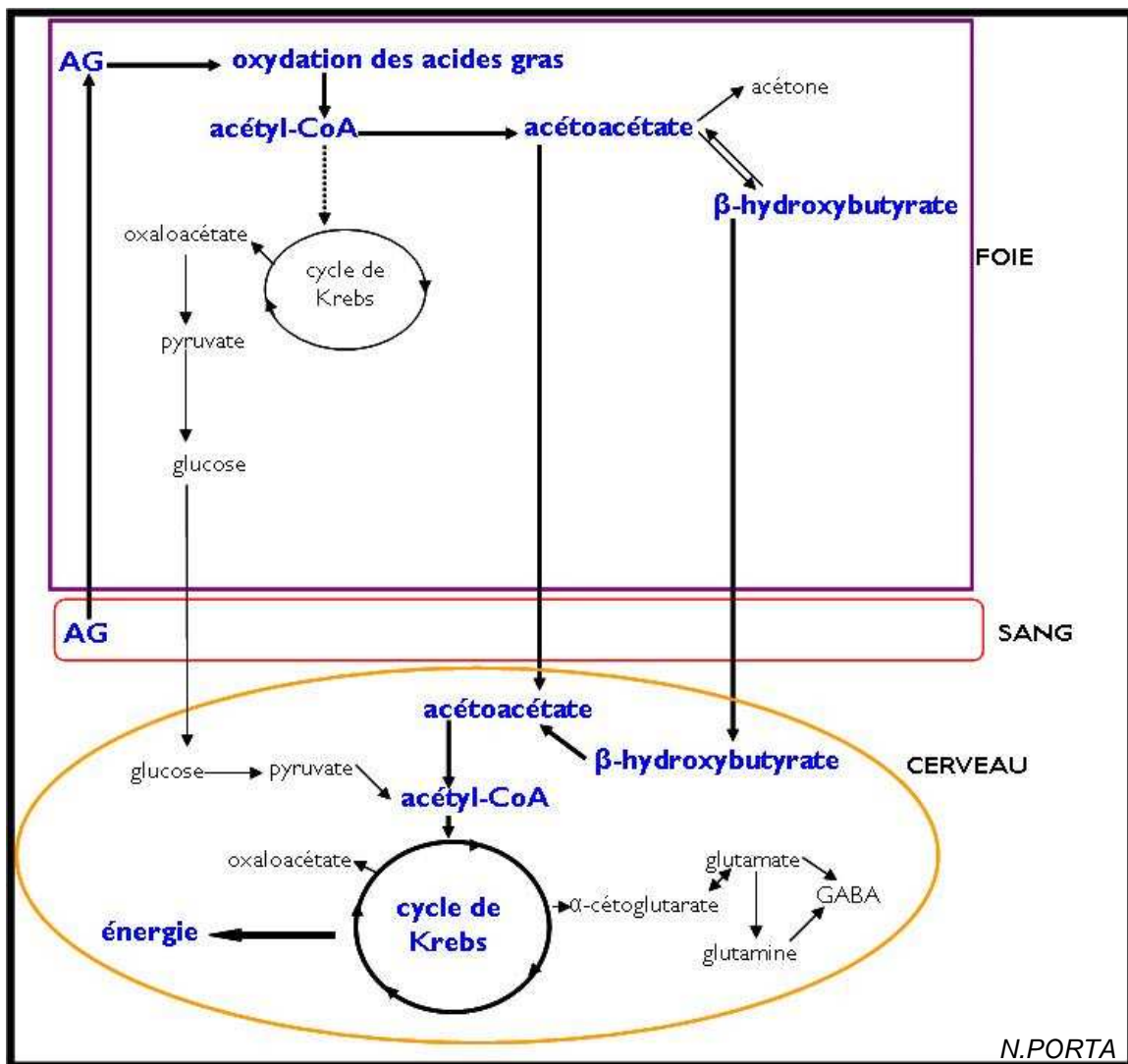
Le régime cétogène est un traitement contraignant. Au cours des dernières décennies les différentes équipes utilisant le régime cétogène ont essayé de développer des formes variantes permettant d'augmenter la compliance des patients.

a) Régime cétogène modifié

Il existe différentes formes de régimes cétogènes. Les ratios lipides versus protéines + glucides peuvent varier. Les ratios 3/1 ou 4/1 sont les plus usités, mais des ratios plus bas sont utilisés avec succès notamment en Asie (Kossoff and McGrogan, 2005). La composition lipidique du régime cétogène comprend plusieurs formes de triglycérides : à longues chaînes (LCT) ou à chaînes moyennes (MCT). Le régime cétogène peut être composé uniquement de LCT ou de MCT, ou bien il peut associer les MCT et les LCT. Quelle que soit la nature des triglycérides administrés, l'efficacité du régime cétogène reste la même (Edelstein and Chisholm, 1996; Schwartz et al., 1989; Vining et al., 1998). Toutefois, les MCT induisent une cétose plus intense que les LCT (Huttenlocher et al., 1971; Schwartz et al.,

1989;Trauner, 1985). Leur utilisation permet d'augmenter la teneur en glucides du régime améliorant ainsi la compliance.

Figure 2 : Changement du métabolisme dans le cadre du régime cétogène. Augmentation de la quantité de lipides (AG) plasmatiques et hépatiques puis augmentation de l'oxydation des acides gras dans les mitochondries, ce qui conduit à un excès d'acétyl-CoA qui est dirigé vers la synthèse des corps cétoniques. Les corps cétoniques (acétoacétate et bêta hydroxybutyrate) sont alors transportés dans le sang jusqu'au cerveau, où ils peuvent entrer dans le cycle de Krebs après transformation en acétyl-CoA. Les intermédiaires produits par le cycle de Krebs peuvent alors intervenir dans la production d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) via les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.



b) Formulation liquide

Les formules complètes sous forme de poudres à reconstituer avec de l'eau, aromatisées ou non, sont essentiellement prescrites chez les enfants en bas âges et peuvent être également administrées par gastrotomie sans modifier l'efficacité du régime (Hosain et al., 2005; Kang et al., 2005; Kang et al., 2006). Ces formules peuvent également être administrées en complément d'un régime solide. Ces formulations liquides ont un aspect pratique que ce soit pour la prescription ou pour la mise en place et le maintien par les familles (Kossoff et al., 2004a). Les familles y trouvent plusieurs avantages : ces formules ont un goût proche des formules lactées utilisées habituellement chez les enfants, elles n'ont pas à préparer les multiples repas et encas du régime cétogène classique, elles n'ont pas à peser les aliments. Enfin ces formules liquides peuvent être administrées chez des patients en soins intensifs (Bodenant et al., 2008).

c) Régime modifié d'Atkins

Le régime modifié d'Atkins consiste à apporter lipides et protéines à volonté sans restriction calorique alors que la quantité journalière de glucides est limitée. Il est recommandé de débiter le régime avec un apport journalier en glucides de 10 g/jour les trois premiers mois et d'augmenter à 15 g/jour ou 20 g/jour si la restriction est mal tolérée (Kossoff et al., 2007). Si l'augmentation de la quantité journalière de glucides est responsable d'une augmentation de la fréquence des crises épileptiques, un retour à 10 g/jour est recommandé. Le régime modifié d'Atkins introduit sans jeûne préalable induit une cétose après environ quatre jours de régime (Kang et al., 2007a; Kossoff et al., 2006). Certains patients présentent une réduction de la fréquence des crises sans pour autant maintenir une cétose élevée. Ce régime présente l'avantage d'être plus permissif que le régime cétogène améliorant ainsi la compliance.

3) Efficacité du régime cétogène et du régime modifié d'Atkins

Le régime cétogène est un traitement efficace dans la prise en charge des épilepsies pharmacorésistantes. Plusieurs études cliniques rapportaient l'efficacité du régime cétogène ou d'un de ses variants, le régime modifié d'Atkins. Plusieurs études s'intéressaient également à évaluer l'efficacité du régime cétogène selon les syndromes épileptiques.

a) Etudes prouvant l'efficacité du régime cétogène

L'efficacité du régime cétogène est essentiellement évaluée par sa capacité à diminuer la fréquence des crises d'épilepsie, mais il contribue également à améliorer le comportement et l'état cognitif de certains patients. Plusieurs études décrivent une amélioration de l'attention, de la concentration, de la socialisation et des progrès scolaires chez les enfants épileptiques sous régime cétogène (Kinsman et al., 1992; Mak et al., 1999; Nordli, Jr. et al., 2001; Pulsifer et al., 2001). L'amélioration comportementale et cognitive observée peut être liée à la diminution de la fréquence des crises d'épilepsie, à la diminution de la médication ou encore à un effet non spécifique du régime cétogène. Il a également été suggéré qu'il pouvait améliorer la qualité du sommeil chez les enfants atteints d'épilepsie (Hallbook et al., 2007b). Concernant l'efficacité antiépileptique, il existe trois études multicentriques (Coppola et al., 2002; Kang et al., 2005; Vining et al., 1998), une étude randomisée (Neal et al., 2008) et une étude randomisée en double aveugle (Freeman et al., 2008). Dans l'étude randomisée menée chez 103 patients âgés de 2 à 16 ans, une réduction de 90 % de la fréquence des crises épileptiques était observée après trois mois de traitement chez 7 % des patients sous régime cétogène versus 0 % dans le groupe contrôle. Une réduction de 50 % de la fréquence des crises épileptiques était observée chez 38 % des patients sous régime cétogène versus 6 % dans le groupe contrôle (Neal et al., 2008). Dans l'étude randomisée en double aveugle, 20 patients ayant un syndrome de Lennox Gastaut étaient inclus. Une meilleure efficacité antiépileptique était rapportée quand le régime cétogène était introduit sans glucose. Chez 9/20 patients, le régime cétogène était introduit en association avec de la saccharine. Après six jours de traitement 6/9 patients présentaient une réduction de la fréquence des crises épileptiques > 50 %. Tandis que chez les 11/20 patients qui recevaient 60 g de glucose par jour à la place de la saccharine, 11/11 patients ne présentaient pas d'amélioration (< 50 %). Pendant les six jours suivants les patients changeaient de groupe. A la fin des douze jours, 65 % des patients présentaient une amélioration des crises > 50 %. Suite à ces douze jours les patients recevaient un régime cétogène sans glucose. Après six mois de régime cétogène, 80 % des patients présentaient une amélioration > 50 % et ce chiffre était de 65 % après douze mois (Freeman et al., 2008). L'étude multicentrique américaine a été menée chez 51 patients âgés de 1 à 8 ans (Vining et al., 1998). Cette étude montrait une diminution > 50 % de la fréquence des crises d'épilepsie chez 54 %, 55 % et 40 % des patients après trois, six et douze mois de régime. L'étude multicentrique italienne réalisée chez 56 patients âgés de 1 à 23 ans montrait une réduction de 50 % de la fréquence des crises d'épilepsie chez 38 %, 27 % et 9 % des patients à trois, six et douze mois de régime (Coppola et al., 2002). Une étude multicentrique coréenne menée

chez 199 patients montrait également une efficacité du régime cétogène avec une diminution de la fréquence des crises d'épilepsie > 50 % chez 58 % et 41 % des patients après six et douze mois de régime (Kang et al., 2005).

Deux études ont cherché à évaluer si l'efficacité du régime cétogène était maintenue dans le temps. La première étude a été menée chez 150 enfants (1 à 16 ans), après douze mois de régime : 55 % des patients étaient toujours sous régime cétogène, 27 % étaient libres de crise, 23 % avaient une baisse de la fréquence des crises > 50 % et 5 % présentaient une réduction de la fréquence des crises < 50 % (Freeman et al., 1998). La deuxième étude correspondait à l'envoi d'un questionnaire à 150 familles pour évaluer la fréquence des crises d'épilepsie et le nombre d'antiépileptiques prescrits. Trois à six ans après le début du régime, 20/150 patients n'avaient plus de crise, 21/150 avaient une diminution de la fréquence des crises > 90 %, 29/150 n'avaient plus de traitement antiépileptique et 28/150 étaient sous monothérapie antiépileptique (Hemingway et al., 2001).

b) Efficacité chez l'adolescent et l'adulte

Il a été initialement suggéré que le régime cétogène ne fonctionnait que chez l'enfant. L'efficacité du régime cétogène a été plus spécifiquement évaluée chez les adolescents dans une étude rétrospective menée chez 45 patients âgés de 12 à 19 ans. Après six mois de régime, 28/45 patients étaient encore sous régime cétogène tandis qu'à douze mois ce chiffre passait à 20/45. 29 % des patients présentaient une diminution de la fréquence des crises > 90 % à six mois, ce chiffre passait à 30 % à douze mois. Une réduction de la fréquence des crises comprise entre 50 % et 90 % était observée chez 21 % des patients à six mois et 35 % à douze mois (Mady et al., 2003).

Le régime cétogène semble également efficace chez l'adulte. Après huit mois de régime, l'efficacité chez 11 adultes (19 à 45 ans) était : trois patients avec une réduction de la fréquence des crises d'épilepsie > 90 %, trois patients avec une réduction de la fréquence comprise entre 50 et 90 % tandis qu'un patient avait une réduction < 50 %. Quatre patients avaient arrêté le régime (Sirven et al., 1999). Des données existent pour les adultes avec le régime modifié d'Atkins. Trente adultes âgés de 18 à 53 ans suivaient un régime contenant 15 g de glucides sans restriction calorique. Après un et trois mois de régime, 47 % des patients présentaient une réduction de la fréquence des crises d'épilepsie > 50 %. A six mois, ce chiffre était de 33 % (Kossoff et al., 2008b). Dans une autre étude menée chez 8 patients recevant un régime modifié d'Atkins avec 20 g de glucides par jour, après six mois 3/8 patients suivaient encore le régime : 1/3 avait une réduction de la fréquence des crises d'épilepsie

> 50 %, 2/3 avait une réduction de la fréquence des crises d'épilepsies < 50 % (Carrette et al., 2008). L'amélioration de la fréquence des crises survenait en moyenne après deux semaines de régime, et 10 sujets ont arrêté le régime avant trois mois.

Les données chez les patients adultes suggèrent que l'efficacité du régime cétogène ou équivalent est identique quel que soit l'âge alors que la tolérance semble plus difficile.

c) Efficacité du régime modifié d'Atkins

L'efficacité du régime modifié d'Atkins est comparable à celle observée avec le régime cétogène (Kang et al., 2007a; Kossoff et al., 2003; Kossoff et al., 2006; Kossoff et al., 2008b). Dans une première étude pilote menée chez 6 patients âgés de 7 à 52 ans, deux patients âgés de 7 et 10 ans étaient libres de crise grâce au régime modifié d'Atkins, un patient âgé de 18 ans présentait une diminution de 90 % de la fréquence des crises d'épilepsie, un patient âgé de 12 ans présentait une réduction de 20 % de la fréquence des crises d'épilepsie tandis que deux patients âgées de 42 et 52 ans ne répondaient pas au régime (Kossoff et al., 2003). Dans une étude prospective menée chez 20 patients, âgés de 3 à 18 ans, 14/20 patients complétaient l'étude à six mois. Les patients recevaient un régime modifié d'Atkins avec un apport journalier en glucides de 10 grammes : 65 % des patients présentaient une réduction de la fréquence des crises d'épilepsie > 50 %, et 35 % des patients avaient une réduction de la fréquence des crises d'épilepsie > 90 % (Kossoff et al., 2006). Dans une autre étude prospective, 14 patients âgés de 2 à 14 ans, recevaient un régime modifié d'Atkins avec un apport journalier en glucides de 10 grammes. A six mois, 7 patients étaient encore sous régime : 36 % avaient une diminution de la fréquence des crises d'épilepsie > 50 % et 21 % des patients étaient libres de crise (Kang et al., 2007a).

Deux études ont également été réalisées chez le patient adulte. Ce régime se révélait efficace dans la prise en charge des épilepsies pharmacorésistantes chez l'adulte, avec une réduction de la fréquence des crises d'épilepsie > 50 % chez 47 % des patients à un et trois mois de régime et chez 33 % des patients à six mois (Kossoff et al., 2008b). Tandis que dans la seconde étude, après six mois de régime, 3/8 patients étaient encore sous régime dont 1/3 présentait une réduction de la fréquence des crises > 50 % et 2/3 présentaient une réduction de la fréquence des crises épileptiques < 50 % (Carrette et al., 2008).

d) Délai d'efficacité et efficacité à long terme

Récemment, le temps médian de mise en place de l'efficacité du régime cétogène a été étudié chez 118 enfants. Une baisse de la fréquence des crises d'épilepsie était observée après cinq jours de régime tandis que 75 % des enfants présentaient une amélioration en 14 jours. Pour les auteurs, l'absence d'amélioration dans les deux premiers mois de régime rend inutile la poursuite de celui-ci (Kossoff et al., 2008a).

e) Marqueurs d'efficacité

Aucun marqueur prédictif de l'efficacité du régime cétogène n'a été mis en évidence à ce jour, bien que plusieurs pistes aient été explorées. L'efficacité du régime cétogène n'est pas corrélée aux taux de cétones dans le sang ou dans les urines (Kang et al., 2007a; Kossoff et al., 2006; Kossoff et al., 2008b), ni à la quantité d'acétone expirée (Musa-Veloso et al., 2006), ni même aux modifications des tracés électro-encéphalographiques (Hallbook et al., 2007a; Remahl et al., 2008).

Les données sur le taux sérique des acides gras poly-insaturés comme marqueur d'efficacité sont contradictoires (Dahlin et al., 2007; Fraser et al., 2003). D'un côté, il a été suggéré qu'il existait une corrélation entre l'augmentation sérique de l'acide arachidonique et la diminution de la fréquence des crises d'épilepsie (Fraser et al., 2003). D'un autre côté, aucune corrélation entre les taux d'acides gras poly-insaturés plasmatiques et la fréquence des crises d'épilepsie n'était retrouvée (Dahlin et al., 2007). Ces variations sériques en acides gras poly-insaturés semblent davantage liées à la composition lipidique des régimes cétogènes.

f) Efficacité par syndrome épileptique

A côté des études d'efficacité rassemblant tous types d'épilepsie, l'efficacité du régime cétogène a été étudiée dans des syndromes épileptiques définis et dans des maladies métaboliques ou génétiques associées à une épilepsie. Les résultats de ces études sont rapportés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Efficacité du régime cétogène par syndromes épileptiques et par maladies métaboliques ou génétiques associées à une épilepsie.

Syndrome épileptique	Nombre de patients	Tolérance	Efficacité	Références
Epilepsie myoclonique sévère (Syndrome de Dravet)	20 patients (2 à 4 ans)	à 12 mois : 13/20	2/20 libres de crise 11/20 amélioration > 50 %	(Caraballo et al., 2005)
	16 patients /199	à 12 mois : 11/16	1/16 libre de crise 9/16 amélioration > 50 % 1/16 amélioration < 50 %	(Kang et al., 2005)
Epilepsie myoclonostatique (Syndrome de Doose)	11 patients (4 à 9 ans)	à 18 mois : 6/11	2/11 libres de crise 4/11 amélioration > 50 %	(Caraballo et al., 2006)
Spasmes infantiles	23 patients (5 mois à 2 ans)	à 6 mois : 18/23 à 12 mois : 13/23	3/23 libres de crise 10/23 amélioration > 50 % 5/23 amélioration < 50 % 3/23 libres de crise 10/23 amélioration > 50 %	(Kossoff et al., 2002b)
	43 enfants (6 mois à 3,5 ans)	à 3 mois : 35/43 à 6 mois : 25/43	30/43 amélioration > 50 % dont 15/43 libres de crise 23/43 amélioration > 50 % dont 17/43 libres de crise	(Eun et al., 2006)
	39 patients /199	à 12 mois : 14/39	13/39 libres de crises 1/39 amélioration > 50 %	(Kang et al., 2005)
Syndrome de Landau-Kleffner	4 patients/199	à 12 mois : 2/4	2/4 libres de crise	(Kang et al., 2005)
	3 patients (9 à 14 ans)	à 12 mois : 3/3	diminution fréquence des crises	(Bergqvist et al., 1999)
Syndrome de Lennox Gastaut	75 patients/199	à 12 mois : 33/75	22/75 libres de crise 8/75 amélioration > 50 % 3/75 amélioration < 50 %	(Kang et al., 2005)
Sclérose tubéreuse de Bourneville	12 patients (8 mois à 18 ans)	à 6 mois : 11/12	3/12 libres de crise 8/12 amélioration > 50 %	(Kossoff et al., 2005)
	3 patients (3,5 ans)	à 2 mois : 3/3	2/3 libres de crise	(Coppola et al., 2006)
Déficit en GluT1	5 patients (11 mois à 15 ans)	pas précisé	Amélioration	(Klepper et al., 2004)
Déficit en complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale	14 patients (9 mois à 11 ans)	à 6 mois : 12/14 à 12 mois : 9/14	6/14 libres de crise 4/14 amélioration > 50 % 2/14 amélioration < 50 % 6/14 libres de crise 2/14 amélioration > 50 % 1/14 amélioration < 50 %	(Kang et al., 2007b)
Syndrome de Rett	7 patients (5 à 10 ans)	à 3 mois : 5/7	1/7 libre de crise 3/7 amélioration > 50 % 1/7 amélioration < 50 %	(Haas et al., 1986)
	1 patient (8 ans)	4 ans	amélioration > 70 %	(Liebhaber et al., 2003)
Syndrome de Lafora	5 patients (âges non précisés)	à 16 mois : 5/5	3/5 aggravations des myoclonies 2/5 nouvelles crises épileptiques	(Cardinali et al., 2006)
Pancéphalite subaiguë sclérosante	1 patient (9 ans)	à 3 mois : 1/1	efficace pendant 3 mois puis réapparition des myoclonies réfractaires	(Bautista, 2003)

Parmi ces maladies, le déficit en transporteur du glucose GLUT1 (maladie de De Vivo) est un cas particulier. Dans ce cas, le régime cétogène n'est pas utilisé comme traitement antiépileptique mais comme traitement curatif. Les patients atteints n'ont pas la capacité d'utiliser le glucose comme substrat. L'utilisation du régime cétogène permet de fournir des substrats énergétiques utilisables (Pascual et al., 2004).

La prise en charge de certains syndromes épileptiques est bien documentée, et le nombre de patients inclus permet d'évaluer l'efficacité du régime cétogène. Les syndromes épileptiques les mieux documentés sont le syndrome de Dravet (épilepsie myoclonique sévère du nourrisson) et les spasmes infantiles. Dans le cadre de ces syndromes épileptiques, une diminution de la fréquence des crises d'épilepsie > 50 % est retrouvée chez plus de 50 % des patients encore sous régime au moment de l'évaluation (généralement à douze mois). Des résultats similaires sont retrouvés pour le syndrome de Lennox Gastaut et le syndrome de Doose (épilepsie myoclonico-astatique), mais les résultats proviennent d'études uniques incluant respectivement 75 et 11 patients.

D'autres maladies ont été étudiées. Mais il y a peu d'études et le nombre de patients inclus est généralement inférieur à 10. Seule la prise en charge de la sclérose tubéreuse de Bourneville par le régime cétogène est un peu plus documentée, avec une amélioration qui survient chez plus de la moitié des patients. Des données suggèrent une efficacité du régime cétogène dans les maladies mitochondriales ou encore le syndrome de Rett. Une étude sur la maladie de Lafora suggère que le régime cétogène n'est pas efficace.

4) Tolérance et effets secondaires

a) Tolérance et mesures pour améliorer la tolérance

Le régime cétogène est contraignant et rigoureux. Cela est illustré par la baisse de l'observance avec le temps dans l'ensemble des études cliniques. Ainsi, l'arrêt du régime pour des raisons non médicales (raisons sociales, refus du régime) était aussi fréquent que l'arrêt pour des raisons médicales [complications ou inefficacité du régime] (Lightstone et al., 2001). De façon non surprenante, les patients avec une efficacité < 50 % sont plus enclins à arrêter le régime (Eun et al., 2006;Freeman et al., 1998;Vining et al., 1998).

Une adaptation du régime cétogène permet parfois d'améliorer la tolérance. L'utilisation d'un ratio de 3/1 est le plus souvent mieux tolérée sur le plan digestif que la version 4/1. Certains auteurs ont suggéré qu'un ratio de 3/1 pourrait être mis en place dès qu'une efficacité est obtenue avec la version 4/1 (Seo et al., 2007). De même, le type de triglycérides influence la tolérance. Les régimes cétogènes riches en MCT ne sont pas bien tolérés, ils induisent plus facilement des douleurs abdominales, des ballonnements et des diarrhées, tandis qu'à l'inverse les régimes riches en LCT induisent plus souvent une constipation. Le régime cétogène peut également être remplacé par le régime modifié d'Atkins, qui apporte 10 à 20 grammes de glucides par jour et qui a une efficacité comparable au régime cétogène.

b) Effets secondaires

Le régime cétogène peut être responsable d'effets secondaires. La gravité de ces effets secondaires est variable (Kang et al., 2004). Parmi ces troubles sont retrouvés les intolérances digestives (Jung et al., 2008), la formation de calculs rénaux (Kielb et al., 2000; Sampath et al., 2007), des retards staturo-pondéraux (Peterson et al., 2005; Vining et al., 2002), une dérégulation des cycles menstruels (Mady et al., 2003; Sirven et al., 1999), une hyperlipémie (Kwiterovich, Jr. et al., 2003), et plus rarement des cas de pancréatites (Kang et al., 2005; Stewart et al., 2001). La prise en charge des effets secondaires peut aider à améliorer la compliance. C'est le cas pour la prise en charge des troubles gastro-intestinaux [nausées, vomissements, constipation, diarrhées, douleurs abdominales] (Jung et al., 2008).

Des carences en vitamine D, en sélénium et en carnitine ont été rapportées (Bergqvist et al., 2003; Bergqvist et al., 2007; Berry-Kravis et al., 2001). Il est donc important d'assurer un suivi étroit des patients sous régime. Quelques cas de myopathies cardiaques avec ou sans déficit en sélénium ont été décrits sous régime cétogène (Bergqvist et al., 2003; Best et al., 2000).

Il est à noter que les effets à long terme au niveau hépatique et musculaire ainsi que l'influence sur le développement athéromateux et de l'ostéoporose n'ont pas encore été évalués chez les patients ayant été traités précocement par le régime cétogène.

c) Interactions médicamenteuses et anesthésie générale

Les études menées sur l'association du régime cétogène avec des inhibiteurs de l'anhydrase carbonique (topiramate, zonisamide...) ne montraient pas de lien entre cette association et l'apparition de calculs rénaux (Kossoff et al., 2002a; Sampath et al., 2007). Une diminution inférieure à 20 % de la concentration en bicarbonate était relevée chez 9/14 patients recevant du topiramate pendant le régime cétogène (Takeoka et al., 2002). L'association des inhibiteurs de l'anhydrase carbonique et du régime cétogène nécessite un suivi rapproché. En cas de formation de calculs rénaux chez ces patients, il est préférable d'arrêter l'inhibiteur de l'anhydrase carbonique.

Un cas clinique suggère une précaution d'emploi du propofol, un agent anesthésique. Un patient traité par régime cétogène est décédé en réanimation suite à l'administration de propofol (Baumeister et al., 2004). Outre ce cas clinique dramatique, 9 patients qui ont eu une anesthésie générale alors qu'ils recevaient un régime cétogène ont été rapportés. Sur les 24 procédures chirurgicales (durée de 20 minutes à 11h30) du propofol a été administré dans trois procédures sans que d'effets indésirables majeurs ne soient rapportés (Valencia et al., 2002). En ce qui concerne la réalisation d'une anesthésie générale chez les patients recevant le régime cétogène, il ne semble pas y avoir de contre indication formelle. Un suivi étroit doit être réalisé pendant l'intervention.

5) Jeûne initial

Plusieurs études rapportent que la mise en place du régime cétogène peut avoir lieu sans jeûne préalable. Dans ces études, l'absence de jeûne facilite la mise en place du régime cétogène et ne modifie pas son efficacité antiépileptique à long terme (Bergqvist et al., 2005; Eun et al., 2006; Kim et al., 2004; Kossoff et al., 2007; Wirrell et al., 2002). Dans une étude randomisée menée chez 48 patients âgés de 1 à 14 ans, deux groupes étaient constitués : avec ou sans jeûne lors de l'introduction du régime cétogène. Trois mois après la mise en place du régime, l'efficacité du régime cétogène était la même dans les deux groupes (Bergqvist et al., 2005). Dans une étude rétrospective, 41 enfants présentant une épilepsie pharmacorésistante recevaient le régime cétogène sans jeûne préalable. Ces 41 enfants étaient comparés à 83 sujets traités antérieurement par régime avec un jeûne initial. A trois mois, les pourcentages de patients libres de crise d'épilepsie étaient similaires : 34,1 % sans jeûne versus 34,9 % avec jeûne (Kim et al., 2004). L'absence de jeûne facilite la compliance et

la tolérance lors de l'instauration du régime cétogène en évitant la survenue d'épisodes d'hypoglycémie.

6) Modifications des antiépileptiques

Le régime cétogène ne modifie pas les taux plasmatiques du valproate, du topiramate, de la lamotrigine, du phénobarbital et du clonazepam (Dahlin et al., 2006). Il ne semble donc pas nécessaire de modifier la posologie des antiépileptiques comme cela a pu être suggéré.

L'efficacité antiépileptique du régime cétogène permet de diminuer le nombre d'antiépileptiques prescrits. Le moment idéal pour réaliser cette diminution n'est pas établi par les données actuelles. Le moment de la baisse des antiépileptiques ne semble pas avoir d'incidence sur l'efficacité du régime cétogène. Il n'y avait pas de différence d'efficacité du régime entre les patients ayant eu une diminution précoce des antiépileptiques (au cours du premier mois) par rapport aux patients ayant eu une diminution tardive (Kossoff et al., 2004b).

7) Régime cétogène : quelles questions, quelles études cliniques

Les données les plus récentes suggèrent une mise en place du régime cétogène plus précocement. Une étude mettait en évidence une action anticonvulsivante identique du régime cétogène qu'il soit mis en place après plusieurs essais d'antiépileptiques, ou chez des patients ayant eu un nombre d'antiépileptiques inférieur ou égal à un (Rubenstein et al., 2005). Dans le cadre de la prise en charge des spasmes infantiles, le régime cétogène pourrait être efficace précocement. Dans une étude, le ratio bénéfice risque dans ce syndrome était meilleur pour le régime cétogène que pour les antiépileptiques (Kossoff et al., 2002b) [Cette étude a été réalisée aux Etats-Unis où le vigabatrin n'est pas encore autorisé]. L'efficacité antiépileptique du régime cétogène est associée à des effets secondaires limités ce qui devrait conduire à ne plus considérer le régime cétogène comme un « traitement de dernière chance ». Cette stratégie thérapeutique mériterait d'être explorée pour une utilisation plus précoce.

DONNEES EXPERIMENTALES

L'efficacité du régime cétogène a été évaluée chez le rongeur. Ces évaluations ont été réalisées à l'aide de plusieurs modèles et les résultats dépendent de nombreux facteurs. L'ensemble de ces résultats est présenté dans la partie suivante.

1) Efficacité du régime cétogène chez le rat

Plusieurs études ont évalué les propriétés anticonvulsivantes du régime cétogène chez le rat. Les propriétés anticonvulsivantes du régime cétogène ont été évaluées par la détermination de seuils d'apparition de crises épileptiques et/ou dans des modèles de crises épileptiques induites chimiquement ou électriquement. Tous les résultats par efficacité sont repris dans le tableau de synthèse (Tableau 5).

a) Modèles expérimentaux : modèles au PTZ

Plusieurs études évaluèrent les propriétés anticonvulsivantes du régime cétogène en utilisant le modèle de seuil au pentylènetétrazole (PTZ, antagoniste GABA) ou un modèle d'injection unique. L'évaluation des propriétés anticonvulsivantes se faisait par une perfusion continue de PTZ par voie veineuse jusqu'à l'apparition de la première clonie bilatérale des pattes avant (Bough et al., 1999a; Bough et al., 1999b; Bough et al., 2000a; Bough et al., 2000b; Bough and Eagles, 1999; Eagles et al., 2003; Raffo et al., 2008; Thavendiranathan et al., 2003; Thavendiranathan et al., 2000) ou par une injection unique de PTZ (s.c., 50-70 ou 85 mg/kg) suivie d'une observation des modifications comportementales des animaux pendant 30 minutes (Likhodii et al., 2000; Thavendiranathan et al., 2000; Thavendiranathan et al., 2003).

Un traitement par le régime cétogène allant de 20 jours à 10 semaines induisait une augmentation des seuils au PTZ dans un modèle de perfusion intraveineuse (i.v.) continue (Bough et al., 1999a; Bough et al., 1999b; Bough et al., 2000a; Bough et al., 2000b; Bough and Eagles, 1999; Eagles et al., 2003; Raffo et al., 2008; Thavendiranathan et al., 2003). La sévérité des crises épileptiques développées par les animaux suite à la perfusion de PTZ n'était pas modifiée (Bough and Eagles, 1999; Raffo et al., 2008). L'augmentation des seuils au PTZ était retrouvée quel que soit l'âge des animaux à l'introduction du régime cétogène. Mais cette efficacité était plus prononcée lorsque le régime cétogène était introduit chez des rats ayant moins de 37 jours de vie (Bough et al., 1999b). L'efficacité du régime cétogène dépendait

également des ratios utilisés. Une augmentation des seuils au PTZ était retrouvée lors de traitement par des régimes de ratios 4/1 et 5/1 mais cette augmentation était plus conséquente avec des régimes de ratios supérieurs à 6/1 (Bough et al., 2000b). En contradiction avec ces résultats, une autre étude rapportait l'inefficacité d'un régime de ratio 4/1 introduit chez de jeunes rats (60 g) et des adultes (300 g) (Nylen et al., 2005). L'efficacité anticonvulsivante du régime cétogène semblait également modulée par les apports caloriques. Les versions hypocaloriques étaient décrites comme plus efficace que les versions normocaloriques (Bough et al., 1999b; Bough et al., 2000a; Bough and Eagles, 1999; Raffo et al., 2008). Ces dernières versions présentaient une efficacité anticonvulsivante inférieure aux versions hypocaloriques (Bough et al., 2000a) ou inexistante (Raffo et al., 2008). Il était également rapporté une efficacité anticonvulsivante d'une restriction alimentaire à 50 ou 65 % des besoins journaliers (Eagles et al., 2003). Cette efficacité était comparable à celle obtenue avec un régime cétogène hypocalorique limité à 90 % des besoins alimentaires journaliers.

Les modèles faisant appel à une injection unique de PTZ (50-70 ou 85 mg/kg, s.c.) évaluaient les effets du régime cétogène sur le délai d'apparition des crises épileptiques, la sévérité des crises et/ou leurs durées (Likhodii et al., 2000; Thavendiranathan et al., 2000; Thavendiranathan et al., 2003). Un traitement de 48 jours par différents régimes cétogènes (beurre, MCT, huile de lin, mélange des trois) mis en place chez de jeunes rats (20 jours) protégeait 18 à 50 % de ces rats de la survenue des crises épileptiques induites par le PTZ [50 mg/kg, s.c.] (Likhodii et al., 2000). La latence d'apparition n'était pas modifiée, mais la sévérité des crises épileptiques était diminuée chez les rats traités par le régime cétogène. Dans une autre étude, de jeunes rats (21 jours) recevant le régime cétogène pendant 21 jours présentaient une augmentation de la latence pour les apparitions de la première clonie des quatre membres, et pour la crise épileptique maximale induite par une injection de PTZ [85 mg/kg, s.c.] (Thavendiranathan et al., 2003). Les animaux traités par le régime cétogène présentaient également une diminution de la mortalité. Les propriétés anticonvulsivantes du régime cétogène n'étaient pas retrouvées dans le modèle utilisant une injection s.c. de 70 mg/kg de PTZ. Un traitement de 10 jours chez des jeunes rats (20 jours) par une version du régime cétogène riche en MCT se révélait inefficace. Les délais d'apparitions du premier sursaut myoclonique et de la première clonie des quatre membres n'étaient pas modifiés dans un modèle d'injection s.c. de PTZ (70 mg/kg) et ces délais étaient même diminués lors d'une injection de 85 mg/kg (s.c.) de PTZ (Thavendiranathan et al., 2000).

b) Modèles expérimentaux : crises épileptiques induites chimiquement

Une efficacité anticonvulsivante du régime cétogène était retrouvée dans des modèles de crises épileptiques induites via une modulation des voies GABAergiques. Dans les modèles utilisant la bicuculline (antagoniste des récepteurs GABA_A), la picrotoxine (antagoniste des récepteurs GABA_A) ou le gamma-butyrolactone (GBL ; agoniste des récepteurs GABA_A) le régime cétogène se révélait efficace. Un traitement de 20 jours chez des rats âgés de 37 jours, retardait l'apparition des décharges de type pointes ondes induites par l'administration de GBL (100 mg/kg, i.p.), et réduisait également le nombre et la durée totale des ces événements (Bough et al., 2002). Toujours dans cette même étude, le régime cétogène réduisait l'incidence des convulsions induites par la bicuculline (1,80 mg/kg, s.c.) et la picrotoxine (1,89 mg/kg, s.c.). Pour cette dernière, la diminution était observée uniquement avec un régime cétogène hypocalorique. Les propriétés anticonvulsivantes du régime cétogène étaient augmentées quand celui-ci était apporté selon la version hypocalorique. En revanche, les auteurs ne retrouvaient pas d'efficacité du régime cétogène dans les modèles utilisant la strychnine (1,80 mg/kg, s.c.) et le kaïnate (10 mg/kg, i.p. ou s.c.) qui agissent sur les voies glutamatergiques. Dans le modèle au kaïnate, les rats ayant reçu le régime cétogène présentaient des crises épileptiques plus sévères et une augmentation de la mortalité.

c) Modèles expérimentaux : crises épileptiques induites par des chocs électriques

Un traitement par le régime cétogène n'induisait pas de protection contre des crises épileptiques induites par une décharge maximale électrique unique [maximal electroshock] (Bough et al., 2000a;Likhodii et al., 2000;Thavendiranathan et al., 2000;Thavendiranathan et al., 2003). Les crises épileptiques sont induites par l'application d'un courant électrique via des électrodes placées sur la cornée. L'intensité du courant délivré varie (de 50 à 150 mA). L'application se fait généralement pendant 0,2 seconde à la fréquence de 60 hertz. Chez des adultes et de jeunes rats un traitement allant de 10 jours à 45 jours par le régime cétogène ne supprimait pas les crises épileptiques (Likhodii et al., 2000;Thavendiranathan et al., 2003) et augmentait même la sévérité de celles-ci (Bough et al., 2000a;Thavendiranathan et al., 2000). Quand le régime cétogène était remplacé par un régime standard la sévérité des crises épileptiques redevenait comparable à celle des animaux témoins (Bough et al., 2000a).

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des effets anticonvulsivants du régime cétoène chez le rat.

Modèles d'évaluation	Efficacité anticonvulsivante du régime cétoène	Références
Seuils au PTZ i.v.	Oui sur le seuil d'apparition des crises épileptiques mais pas d'effet sur la sévérité des crises épileptiques	(Bough et al., 1999a; Bough et al., 1999b; Bough et al., 2000a; Bough et al., 2000b; Bough and Eagles, 1999; Eagles et al., 2003; Raffo et al., 2008; Thavendiranathan et al., 2003)
	Pas d'effet d'un régime de ratio 4/1 sur le seuil d'apparition des crises épileptiques	(Nylen et al., 2005)
Dose unique de PTZ s.c.	Protège de la survenue des crises épileptiques et diminue la sévérité (50 mg/kg, s.c.). Augmente la latence d'apparition des crises épileptiques et diminue la mortalité (85 mg/kg, s.c.)	(Likhodii et al., 2000; Thavendiranathan et al., 2003)
	Pas d'effet sur la latence d'apparition des crises épileptiques (70 mg/kg, s.c.) et diminution des latences d'apparition (85 mg/kg, s.c.)	(Thavendiranathan et al., 2000; Thavendiranathan et al., 2003)
Crises induites par la bicuculline (1,8 mg/kg, s.c.), la picrotoxine (1,89 mg/kg, s.c.), ou le GBL (100 mg/kg, i.p.)	Oui sur le délai d'apparition, et sur le nombre de crises épileptiques	(Bough et al., 2002)
Crises induites par la strychnine (1,8 mg/kg, s.c.)	Aucun effet	(Bough et al., 2002)
Crises induites par le kaïnate (10 mg/kg i.p. ou s.c.)	Aucun effet sur le délai d'apparition, ni sur les crises épileptiques	(Bough et al., 2002)
Maximal electroshock	Pas d'effet ou aggravation de la sévérité des crises épileptiques	(Bough et al., 2000a; Likhodii et al., 2000; Thavendiranathan et al., 2000; Thavendiranathan et al., 2003)
Seuils électro-convulsifs	Oui sur le seuil d'apparition des crises épileptiques	(Appleton and DeVivo, 1974; Thavendiranathan et al., 2003)
	Pas d'effet sur le seuil d'apparition	(Thavendiranathan et al., 2000)
Crises induites par des stimuli sonores	Oui suite à une hypoxie cérébrale	(Tai and Truong, 2007)
	Non chez des rats déficient en magnésium	(Mahoney et al., 1983)
Crises répétées spontanées suites à un état de mal épileptique induit par le kaïnate (8 mg/kg, i.p.)	Oui si le traitement est mis en place précocement après l'état de mal épileptique	(Muller-Schwarze et al., 1999; Stafstrom et al., 1999; Su et al., 2000)
Crises épileptiques chez des animaux kindlés (kindling électrique de l'amygdale)	Pas d'effet sur le seuil d'apparition des crises épileptiques	(Nylen et al., 2006)
	Oui mais transitoire	(Hori et al., 1997)

Certaines de ces études évaluaient les seuils électro-convulsifs (seuil d'apparition des crises épileptiques). Ce modèle consiste à appliquer un courant d'une intensité donnée le premier jour puis à adapter l'intensité du courant les jours suivants, en fonction de la réponse des animaux (augmentation si pas de réponse, et diminution proportionnelle à la sévérité de la réponse). Deux études rapportaient une augmentation de ces seuils chez de jeunes rats (20 jours) et des adultes [poids non précisés] (Appleton and DeVivo, 1974;Thavendiranathan et al., 2003) tandis que dans une autre étude menée chez de jeunes rats (20 jours), les seuils n'étaient pas affectés (Thavendiranathan et al., 2000).

d) Modèles expérimentaux : crises épileptiques induites par des stimulations sonores

Les propriétés anticonvulsivantes du régime cétogène ont été évaluées dans un modèle de crises épileptiques induites par le son chez des rats adultes déficients en magnésium (Mahoney et al., 1983). Chez ces rats, un traitement de 17 jours par le régime cétogène avait des effets négatifs. Après 17 jours de traitement, les animaux présentaient une augmentation de l'incidence et de la sévérité des crises épileptiques ainsi qu'une diminution de la latence d'apparition. Dans une autre étude, il était rapporté qu'un traitement de 25 jours par le régime cétogène chez de jeunes rats (150 g) supprimait les crises épileptiques et diminuait l'incidence des myoclonies induites par une stimulation auditive. Cette étude était réalisée chez des rats ayant eu initialement une hypoxie cérébrale induite par un arrêt cardiaque (Tai and Truong, 2007).

e) Modèles expérimentaux : prévention de la récurrence des crises épileptiques dans les modèles de kindling électrique et d'état de mal épileptique

L'efficacité du régime cétogène a été également évaluée sur la prévention de la récurrence des crises épileptiques dans des modèles de « kindling » électriques de l'amygdale (Hori et al., 1997;Nylen et al., 2006) et dans des modèles d'état de mal épileptique (Muller-Schwarze et al., 1999;Stafstrom et al., 1999;Su et al., 2000).

Des rats adultes « kindlés » (« kindling » électrique de l'amygdale) recevaient le régime cétogène pendant 20 jours puis le seuil d'intensité des stimulations électriques pour l'apparition des crises épileptiques était évalué. Dans une étude, ce seuil n'était pas modifié (Nylen et al., 2006) alors que dans une autre étude l'augmentation du seuil était transitoire (Hori et al., 1997). Dans cette dernière étude, le seuil électrique d'apparition des crises

épileptiques était augmenté pendant les deux premières semaines de traitement, puis cette augmentation disparaissait après quatre à cinq semaines de régime cétogène. Une efficacité du régime cétogène était également rapportée sur la prévention des crises épileptiques répétées spontanées survenant à la suite d'un modèle d'état de mal épileptique induit par une injection de kainate [8 mg/kg, i.p.] (Muller-Schwarze et al., 1999; Stafstrom et al., 1999; Su et al., 2000). Les états de mal épileptiques étaient induits chez des jeunes rats (30 jours) et des adultes (54 jours). Une diminution de la fréquence et du nombre de crises épileptiques répétées spontanées était retrouvée uniquement quand le régime cétogène était mis en place précocement (0 à 48 heures) après l'état de mal épileptique (Muller-Schwarze et al., 1999; Stafstrom et al., 1999; Su et al., 2000). En revanche, les animaux recevant le régime cétogène 14 jours après l'état de mal épileptique ne présentaient pas de diminution des crises épileptiques répétées spontanées (Su et al., 2000).

2) Efficacité du régime cétogène chez la souris

Chez la souris, les études évaluant les propriétés anticonvulsivantes du régime cétogène sont moins nombreuses que chez le rat. Les résultats ne sont pas homogènes, et dépendent des lignées utilisées. De ce fait, l'action du régime cétogène est difficile à évaluer. Mais l'avantage de réaliser ces évaluations chez la souris reste la disponibilité de modèles de souris génétiquement modifiées ou de souris épileptiques telles que les souris de la lignée EL mice. L'ensemble des résultats par efficacité est repris dans un tableau de synthèse (tableau 6).

a) Modèles expérimentaux : seuil au PTZ et crises épileptiques induites chimiquement

Une seule étude rapporte une évaluation des propriétés anticonvulsivantes du régime cétogène par la réalisation d'un seuil au PTZ i.v. chez des souris adultes. Dans cette étude, après 19 jours de traitement par le régime cétogène (4/1 et 6/1) les animaux ne présentaient pas de modification des seuils au PTZ pour le premier sursaut myoclonique et pour la première crise d'épilepsie tonique (Samala et al., 2008). Des études plus anciennes rapportaient des résultats négatifs concernant l'efficacité anticonvulsivante du régime cétogène dans des modèles de crises épileptiques induites par le PTZ et la bicuculline (Otani et al., 1984; Uhlemann and Neims, 1972).

Dans les modèles utilisant le kaïnate, les résultats obtenus dépendent des études et des souches de souris utilisées. Une étude utilisant des souris ICR rapportait une efficacité du régime cétogène dans le modèle d'état de mal épileptique induit par le kaïnate (Noh et al., 2003). Dans cette étude, un traitement d'un mois par le régime cétogène était introduit chez des souris âgées de 21 jours. Ce traitement retardait l'apparition de l'état de mal épileptique (kaïnate 25 mg/kg, i.p.) mais n'affectait en rien la sévérité des crises épileptiques développées par les animaux. En revanche, dans une autre étude réalisée chez de jeunes souris C3Heb/Fej (21 jours), 16 jours de traitement par le régime cétogène n'affectait ni le délai d'apparition de l'état de mal épileptique (kaïnate 25 à 35 mg/kg, i.p.) ni la sévérité des crises épileptiques (Samala et al., 2008).

Deux études rapportaient une évaluation des propriétés anticonvulsivantes du régime cétogène dans le modèle au fluorothyl. Dans une étude réalisée chez des souris CD1 des traitements de 7, 14 ou 21 jours par le régime cétogène (6/1) était introduit à l'âge de 21 jours. Seul le traitement de 21 jours retardait l'apparition de la première extension clonique. En revanche, aucune modification n'était retrouvée pour l'apparition de la première myoclonie (Samala et al., 2008). Une autre étude évaluait les propriétés anticonvulsivantes d'un traitement par le régime cétogène de 3, 7 ou 12 jours chez de jeunes souris C3Heb/Fej (24 jours), et d'une durée de 15 jours chez des adultes (52 jours) de la même lignée (Rho et al., 1999). Dans cette étude, les jeunes souris traitées 7 et 12 jours par le régime cétogène présentaient une augmentation du délai d'apparition de la crise d'épilepsie généralisée tandis que 15 jours de traitement chez les sujets adultes augmentaient le délai d'apparition de la première extension clonique.

b) Modèles expérimentaux : crises épileptiques induites par des chocs électriques

Les résultats des études utilisant une évaluation par seuils électroconvulsifs et/ou par une décharge électrique maximale unique sont contrastés chez la souris. Dans ces études, comme chez les rats, une décharge électrique unique [maximal electroshock] ou répétée à quelques jours d'intervalle (seuil électroconvulsif) est appliquée au niveau de la cornée via des électrodes. Certaines études rapportaient une efficacité du régime cétogène dans le modèle du « maximal electroshock » (Nakazawa et al., 1983; Uhlemann and Neims, 1972) tandis que d'autres études ne retrouvaient pas une telle efficacité (MILLICHAP et al., 1964; Otani et al., 1984). Il en est de même pour les évaluations avec les seuils électroconvulsifs. Dans une étude, les résultats rapportés étaient en faveur d'une efficacité anticonvulsivante du régime

cétogène (MILLICHAP et al., 1964) tandis que dans une autre les résultats étaient inverses (Uhlemann and Neims, 1972).

Plus récemment, des études ont évalué l'efficacité anticonvulsivante du régime cétogène dans un modèle de crises épileptiques induites par une décharge électrique à la fréquence de 6 hertz. Cette décharge est délivrée via des électrodes appliquées sur la cornée. Dans une étude après 14 ou 21 jours de traitement par le régime cétogène de ratio 6/1 des souris CD1 (21 jours) présentaient une augmentation du seuil d'intensité du courant nécessaire à l'apparition de la crise épileptique (Samala et al., 2008). Ces résultats étaient retrouvés de façon transitoire après 14 jours de traitement par un régime cétogène de ratio 4/1. Mais ces effets n'étaient pas retrouvés après 21 jours de ce même traitement. Dans une autre étude des effets anticonvulsivantes transitoires d'un régime cétogène de ratio 6/1 étaient retrouvés chez des souris swiss âgées de 3-4 semaines. Ces effets anticonvulsivants étaient retrouvés après 12 et 16 jours de traitement mais ils disparaissaient à 21 jours (Hartman et al., 2008).

c) Modèles expérimentaux : souris EL Mice

Les souris EL mice sont un modèle d'épilepsie idiopathique multifactorielle. Les souris développent des crises épileptiques à partir de 60 ou 70 jours de vie. Ces crises épileptiques sont déclenchées par une stimulation vestibulaire lors du changement de cage ou lors de la manipulation des animaux (King, Jr. and LaMotte, 1989). L'évaluation des propriétés anticonvulsivantes du régime cétogène dans ce modèle se faisait une fois par semaine lors du changement des cages (Greene et al., 2001;Mantis et al., 2004;Todorova et al., 2000) De jeunes souris âgées de 30-32 jours, traitées 10 semaines par le régime cétogène présentaient une diminution transitoire de la sévérité des crises épileptiques (Todorova et al., 2000). Cette diminution s'observait entre la troisième et la sixième semaine de traitement, mais dès la quatrième semaine, la sévérité des crises épileptiques augmentait progressivement pour rejoindre le niveau des témoins dès sept semaines de traitement. Deux autres études évaluaient les effets d'une restriction calorique chez ces souris (Greene et al., 2001;Mantis et al., 2004). Une restriction calorique pendant 10 semaines (nourriture standard uniquement) retardait l'apparition des crises épileptiques chez les jeunes souris (âge non précisé) et chez les adultes (Greene et al., 2001). Dans cette même étude, les auteurs comparaient leurs résultats aux résultats précédemment obtenus avec le régime cétogène. Une meilleure efficacité anticonvulsivante était relevée chez les souris EL mice ayant reçu une restriction calorique. Les effets positifs de la restriction calorique étaient retrouvés dans une autre étude, où après 5 à 12 semaines de restriction calorique (nourriture standard et régime cétogène) les

souris présentaient une diminution du nombre de crises épileptiques par rapport aux souris ayant eu une alimentation à volonté (Mantis et al., 2004).

d) Modèles expérimentaux : souris génétiquement modifiées

Les propriétés anticonvulsivantes du régime cétogène ont été évaluées chez des souris déficientes en dopamine bêta-hydroxylase (Dhb^{-/-}) ou déficientes en transporteur pour la noradrénaline (NET^{-/-}). Les souris Dhb^{-/-} ne synthétisent pas la noradrénaline tandis que chez les souris NET^{-/-} la concentration en noradrénaline dans la fente synaptique est augmentée suite à un défaut de recapture. Une étude menée chez des souris Dhb^{-/-} mettait en évidence l'implication du système noradrénergique dans l'apparition des crises épileptiques (Szot et al., 1999). Chez ces souris déficientes en noradrénaline, les seuils de crises induites par le fluorothyl, le kaïnate (20 mg/kg, i.p.), le PTZ (30-40 mg/kg, i.p.) ou par un stimulus sonore étaient diminués par rapport au souris Dhb^{+/-}. La sévérité des crises épileptiques et la mortalité étaient également augmentées chez ces souris Dhb^{-/-}. Un traitement de deux semaines par le régime cétogène chez des souris Dhb^{-/-} était inefficace (Szot et al., 2001). Les souris Dhb^{-/-} traitées par le régime cétogène présentaient des seuils de crises épileptiques induites par le fluorothyl comparables aux souris sauvages recevant une alimentation standard. Les souris NET^{-/-} présentaient une augmentation des seuils pour l'apparition des crises épileptiques induites par une décharge électrique unique [maximal electroshock] (Martillotti et al., 2006). Cette augmentation était comparable aux résultats obtenus pour les souris sauvages traitées par le régime cétogène. Les souris NET^{-/-} traitées par le régime cétogène présentaient une augmentation du seuil de crise plus conséquent que les souris sauvages traitées par régime cétogène. Ces études soulignent que l'action anticonvulsivante du régime cétogène n'est possible que si le système noradrénergique est intègre.

Une évaluation du régime cétogène était également réalisée dans un modèle de souris déficientes en succinic semi-aldéhyde déhydrogénase (SSADH). Ces souris présentent un excès de GABA conduisant à des troubles du développement, une ataxie, ainsi que des crises épileptiques et/ou état de mal épileptique. Les souris déficientes en SSADH traitées par le régime cétogène présentaient une augmentation de la durée de vie, une apparition retardée de l'ataxie ainsi qu'une normalisation des tracées EEG (Nylen et al., 2008).

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des effets anticonvulsivants du régime cétogène chez la souris.

Modèle d'évaluation	Efficacité anticonvulsivante du régime cétogène	Références
Seuil PTZ i.v.	Pas d'efficacité retrouvée	(Samala et al., 2008)
Modèle au PTZ s.c.	Pas d'efficacité retrouvée	(Otani et al., 1984;Uhlemann and Neims, 1972)
Crises épileptiques induites par la bicuculline	Pas d'efficacité retrouvée	(Uhlemann and Neims, 1972)
Etat de mal épileptique induit par le kaïnate	Oui sur le délai d'apparition de l'état de mal épileptique (25 mg/kg, i.p.)	(Noh et al., 2003)
	Pas d'effet retrouvé (25-35 mg/kg, i.p.)	(Samala et al., 2008)
Crises épileptiques induite par le fluorothyl	Oui mais effet dépendant de l'âge	(Rho et al., 1999;Samala et al., 2008)
Maximal electroshock	Oui	(Nakazawa et al., 1983;Uhlemann and Neims, 1972)
	Pas d'efficacité	(MILLICHAP et al., 1964;Otani et al., 1984)
Seuils électroconvulsifs	Oui	(MILLICHAP et al., 1964)
	Pas d'efficacité	(Uhlemann and Neims, 1972)
Modèle de crises épileptiques 6 hertz	Oui	(Hartman et al., 2008;Samala et al., 2008)
Souris EL mice	Oui mais efficacité transitoire	(Greene et al., 2001;Mantis et al., 2004;Todorova et al., 2000)
Souris génétiquement modifiées	Oui dans le modèle de maximal electroshock (souris NET-/-)	(Martillotti et al., 2006)
	Normalisation des tracés EEG chez les souris déficiente en SSADH	(Nylen et al., 2008)
	Non (souris Dhb-/-)	(Szot et al., 2001)

3) Efficacité globale du régime cétogène chez le rongeur

Les différentes études présentées précédemment mettent en évidence l'existence de propriétés anticonvulsivantes portées par le régime cétogène, chez le rongeur. Toutefois, les résultats obtenus chez le rat et la souris sont difficilement comparables car ils diffèrent selon les modèles expérimentaux utilisés. L'évaluation par les seuils i.v. au PTZ chez les rats montre que le régime cétogène a des propriétés anticonvulsivantes. En revanche, chez la souris les études sont peu nombreuses et les résultats obtenus sont négatifs. En ce qui concerne l'évaluation via des modèles de crises épileptiques induites par des chocs électriques, le régime cétogène n'a pas d'effet anticonvulsivant chez le rat tandis que chez la souris certaines études rapportaient une efficacité anticonvulsivante notamment dans le modèle à 6 hertz.

Chez la souris il y a peu d'études qui évaluent les effets du régime cétogène sur des crises épileptiques induites chimiquement et dans ces études il existe une grande variabilité des résultats liée aux lignées de souris utilisées. L'avantage de la modélisation et de l'évaluation des propriétés anticonvulsivantes du régime cétogène chez la souris est l'existence de souris génétiquement modifiées. Les effets anticonvulsivants du régime cétogène chez le rongeur dépendent de nombreux paramètres (espèces et lignées, âge des animaux, modèle d'évaluation..) dont il faut tenir compte pour conclure sur l'efficacité anticonvulsivante du régime cétogène.

MECANISMES D'ACTION DU REGIME CETOGENE

Le régime cétogène possède des propriétés anticonvulsivantes décrites précédemment chez l'Homme et dans certains modèles animaux. Le ou les mécanismes d'action portant les propriétés anticonvulsivantes d'un tel traitement sont hypothétiques. Nous aborderons ici les aspects suivants : l'implication des corps cétoniques, la modulation de la neurotransmission, les changements métaboliques, l'implication des acides gras poly-insaturés ou encore l'action neuroprotectrice du régime cétogène.

1) Rôle des corps cétoniques

Plusieurs études ont évalué les propriétés anticonvulsivantes des corps cétoniques (acétone, acétoacétate (ACA) et bêta hydroxybutyrate (BHB)) chez les rongeurs dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Rappelons ici que dans les études cliniques le niveau de cétose (Kang et al., 2007a; Kossoff et al., 2006; Kossoff et al., 2008b) et la quantité d'acétone expirée (Musa-Veloso et al., 2006) n'étaient pas corrélés à l'efficacité du régime cétogène.

a) Acétone

L'acétone a des propriétés anticonvulsivantes qui sont observées chez le rongeur suite à une injection unique. Soixante pour cent des rats (350 g) ayant reçu une injection d'acétone (10 mmol/kg, i.p.) ne présentaient pas de crises épileptiques suite à l'administration de PTZ (50 mg/kg, s.c.) 15 minutes après l'injection d'acétone (Likhodii and Burnham, 2002). Toujours chez des rats (250-300 g), l'administration unique d'acétone (2, 4, 6, 8, 16 ou 32 mmol/kg, i.p.) conduisait à une diminution de la survenue des crises épileptiques (Likhodii et al., 2003). Chez

ces animaux 50 % de protection était obtenue dans différents modèles, pour différentes posologies d'acétone (ED_{50}) : crises induites par un choc électrique unique [maximal electroshock] 30 minutes après l'administration d'acétone (ED_{50} 6,6 mmol/kg), évaluation de l'intensité de la décharge électrique pour l'apparition des crises épileptiques dans un modèle de « kindling » électrique de l'amygdale (ED_{50} pour les crises épileptiques partielles : 26,5 mmol/kg et généralisées : 13,1 mmol/kg), crises épileptiques induites 15 minutes après l'administration d'acétone par du PTZ (50 mg/kg, s.c., ED_{50} 9,7 mmol/kg). Toujours dans cette étude, une diminution de 50 % des décharges de type pointes ondes était obtenue dans le modèle AY-9944 (modèle d'absences atypiques, injection de 7,5 mg/kg d'AY-9944 en s.c. tous les six jours du 2nd jour de vie au 20^{ième}) pour une ED_{50} de 4 mmol/kg. Chez des souris susceptibles aux crises audiogènes, l'administration d'acétone (10 mmol/kg, i.p.) 50 minutes avant l'induction des crises épileptiques avait aussi des propriétés anticonvulsivantes (Rho et al., 2002). Dans cette dernière, l' ED_{50} était de 3,1 mmol/kg d'acétone. Un traitement chronique (10 jours) par de l'acétone (via l'eau de boisson) se révélait moins efficace, et induisait une protection des crises épileptiques induites par le PTZ (50 mg/kg, s.c.) chez seulement 47 % des rats (Likhodii and Burnham, 2002). Dans cette étude, les animaux recevaient en plus du traitement chronique une injection d'acétone (1 mmol/kg, i.p.) 15 minutes avant l'administration de PTZ.

L'administration des principaux métabolites de l'acétone (acétol, 1,2–propanediol, methylglyoxal et pyruvate) à des souris (19-30 g) n'induisait pas de protection dans les modèles de seuils au PTZ (i.v.) et au 4-aminopyridine [4-AP, 13 mg/kg, s.c.] (Gasior et al., 2007). Dans cette étude, les auteurs retrouvaient un effet dose-dépendant de l'acétone (1-32 mmol/kg, i.p.) sur l'augmentation des seuils au PTZ avec une dose minimale efficace de 3,2 mmol/kg. Un effet de l'acétone était également retrouvé dans le modèle 4-AP. Mais lorsque les principaux métabolites de l'acétone (acétol, 1,2–propanediol, methylglyoxal et pyruvate) étaient administrés, ces effets anticonvulsivants n'étaient pas retrouvés. L'acétol, le 1,2–propanediol et le pyruvate étaient administrés à la posologie de 32 mmol/kg (i.p.) soit l'équivalent de 10 fois la dose minimale efficace d'acétone. Pour de telles posologies, aucun effet anticonvulsivant n'était retrouvé. Finalement, des rats (250 g) « kindlés » électriquement au niveau de l'amygdale, qui recevaient le régime cétogène contenant un inhibiteur du métabolisme de l'acétone (diallyl sulfide) pendant 40 jours présentaient une augmentation de l'acétone plasmatique, sans que cette augmentation soit corrélée à une efficacité du traitement (Nylen et al., 2006).

b) Acétoacétate

Peu d'études ont évalué les propriétés anticonvulsivantes de l'ACA. Une étude *in vitro* rapportait que l'application d'ACA contenu dans un mélange ACA + BHB (respectivement 1 mM + 2 mM), sur des tranches hippocampiques issues de rats âgés de 20 à 35 jours ne modulait pas la réponse à la stimulation des fibres des collatérales de Schaffer (Thio et al., 2000). Le mélange ACA + BHB ne modulait pas les décharges épileptiformes induites par l'application de 4-AP (4-aminopyridine, 50 μ M). Toujours dans cette étude, l'application de l'ACA (1 mM) sur des neurones isolés n'induisait pas de modulation de la réponse à l'application de glutamate (2 μ M, et 200 à 1000 μ M), de kaïnate (250 μ M), de GABA (10 à 20 μ M) et de glycine (50 à 500 μ M). L'application d'ACA (2 mM) sur des tranches contenant la région substantia nigra pars reticulata de rats et de souris (âgés de 13 à 15 jours lors du sacrifice) diminuait de 10 % les trains de potentiels d'action spontanés des neurones GABA de la région substantia nigra pars reticulata (Ma et al., 2007). Ces résultats étaient retrouvés chez les rats et les souris, et également lors d'enregistrement de neurones GABA isolés. Lorsque la même étude était réalisée suite à l'application d'inhibiteurs des canaux potassiques ATP dépendant (K_{ATP}) ou chez des souris KO pour les K_{ATP} , les effets de l'ACA n'étaient pas retrouvés. Les auteurs suggéraient donc que l'action de l'ACA se faisait via la modulation des canaux K_{ATP} . L'activation de ces canaux induisait une hyperpolarisation cellulaire favorisant ainsi la diminution des trains de potentiels d'action.

Une étude *in vivo* rapportait une efficacité anticonvulsivante de l'ACA (10 mmol/kg, i.p.). L'injection d'ACA 50 minutes avant l'induction des crises épileptiques avait des propriétés anticonvulsivantes chez des souris susceptibles aux crises épileptiques audiogènes (Rho et al., 2002).

c) Bêta hydroxybutyrate

Les études *in vitro* évaluant les propriétés anticonvulsivantes du BHB sont les mêmes que celles évaluant les propriétés anticonvulsivantes de l'ACA. L'application de BHB contenu dans le mélange ACA + BHB sur des tranches hippocampiques ou sur des neurones isolés de rats ne modulait pas les décharges épileptiformes induites par le 4-AP, ni la réponse à la stimulation des fibres des collatérales de Schaffer (Thio et al., 2000). En revanche, l'application de R-BHB (2 mM) sur des tranches de substantia nigra pars reticulata limitait les potentiels d'action spontanés via une modulation des canaux K_{ATP} (Ma et al., 2007).

Dans l'ensemble des études *in vivo*, le niveau de cétose des animaux était évalué par un dosage plasmatique du BHB. Dans une étude évaluant les propriétés anticonvulsivantes du régime cétogène par des seuils au PTZ (i.v.), le degré de cétose était corrélé à l'efficacité anticonvulsivante du régime cétogène (Bough and Eagles, 1999). Mais cette corrélation n'était pas observée dans les autres travaux, que ce soit chez les rats ou les souris. Cette absence de corrélation entre efficacité anticonvulsivante du régime cétogène et taux plasmatique de BHB était retrouvée dans d'autres modèles animaux : modèle de crises épileptiques à 6 hertz (Hartman et al., 2008), crises épileptiques et seuils au PTZ (s.c. de 50 à 85 mg/kg ou i.v.), seuils électroconvulsifs et modèle de crises induites par une décharge électrique unique (Bough et al., 2000b; Harney et al., 2002; Likhodii et al., 2000; Raffo et al., 2008; Thavendiranathan et al., 2000). Une autre étude présentait des résultats contrastés, et dépendants des modèles de crises épileptiques utilisés. Il était retrouvé une corrélation positive entre l'augmentation du BHB plasmatique et l'augmentation des seuils d'apparition des crises épileptiques dans un modèle à 6 hertz (Samala et al., 2008). Mais ces résultats n'étaient pas retrouvés dans les modèles au fluorothyl et au PTZ (i.v.).

2) Modulation de la neurotransmission

Plusieurs études rapportaient des modulations des concentrations en acides aminés et/ou en neurotransmetteurs suite à un traitement par le régime cétogène chez des rats ou des souris. Une étude clinique rapportait des modifications de la concentration de certains neurotransmetteurs dans le liquide céphalorachidien de patients recevant le régime cétogène. Les propriétés anticonvulsivantes du régime cétogène pourraient être liées à une modulation de la neurotransmission.

a) Noradrénaline

Comme nous l'avons succinctement décrit précédemment, une altération des voies noradrénergiques (souris *Dhb*^{-/-}) conduit à diminuer le seuil d'apparition des crises épileptiques induites par le fluorothyl, le kaïnate, le PTZ ou des stimuli sonores (Szot et al., 1999). Nous avons aussi décrit que le traitement par le régime cétogène chez des souris déficientes en noradrénaline (*Dbh*^{-/-}) était inefficace (Szot et al., 2001), tandis que chez des souris présentant un excès de noradrénaline dans la fente synaptique (*NET*^{-/-}) le régime cétogène était efficace (Martillotti et al., 2006). Une autre étude rapportait une augmentation d'un facteur deux de la concentration en noradrénaline extracellulaire dans l'hippocampe, suite

à un traitement par le régime cétoène chez des rats (Weinshenker and Szot, 2002). Ces résultats suggèrent que la noradrénaline est indispensable pour assurer l'efficacité du régime cétoène, et que cette efficacité pourrait être liée à une augmentation de celle-ci.

b) Glutamate et aspartate

Une modulation de la concentration et/ou de la disponibilité des neurotransmetteurs excitateurs a été évoquée pour expliquer le pouvoir anticonvulsivant du régime cétoène. Plusieurs études rapportaient des variations de la concentration en neurotransmetteurs excitateurs tels que le glutamate et l'aspartate. Mais ces résultats n'étaient pas homogènes. Une étude menée *in vitro* sur des astrocytes issus de rats montrait que l'application d'ACA ou de BHB (5 mM) dans le milieu de culture réduisait de 40 à 50 % la transamination du glutamate en aspartate (Yudkoff et al., 1997). Toujours dans cette étude, le glutamate et la glutamine marqués sur un atome d'azote n'étaient pas ou peu utilisés pour la réaction de transamination du glutamate en aspartate lorsque le milieu de culture contenait de l'acétate. Selon les auteurs, la diminution de cette transamination serait liée à la diminution de la disponibilité de l'oxaloacétate et à l'augmentation de l'acétyl-CoA (provenant de l'acétoacétyl-CoA) dans les mitochondries pendant la cétose.

Dans des études *in vivo* menées chez des souris (25-30 g) traitées trois jours par le régime cétoène, une diminution de la concentration cérébrale en aspartate était retrouvée (Yudkoff et al., 2001; Yudkoff et al., 2005). La diminution de la concentration en aspartate était de 23 % dans le cerveau et de 15 % dans le cervelet (Yudkoff et al., 2001), ou de 23 % dans l'ensemble du cerveau (Yudkoff et al., 2005). Cette diminution de l'aspartate au niveau cérébral ne s'accompagnait pas de changement pour les concentrations de glutamate et de glutamine (Yudkoff et al., 2001; Yudkoff et al., 2005). Tandis qu'une autre étude *in vivo* retrouvait une diminution de la concentration en glutamate dans le cortex, chez des rats spontanément épileptiques (GAERS) âgés de cinq mois traités 21 jours de régime cétoène (Melo et al., 2006). La concentration en glutamate dans le cortex diminuait de 8,5 %. Cette diminution n'était pas accompagnée de variation de la concentration en aspartate. Finalement, dans une étude clinique, il n'était pas rapporté de variation de la concentration en glutamate et en aspartate dans le liquide céphalorachidien des patients, qu'ils répondent ou pas au traitement (Dahlin et al., 2005). Les concentrations en aspartate étaient respectivement de 0,26 +/- 0,2 µmol/L et 0,31 +/- 0,1 µmol/L chez les patients qui répondaient et qui ne répondaient pas au régime cétoène. Les concentrations de glutamate étaient respectivement de 0,58 +/- 0,2 µmol/L et de 0,74 +/- 0,3 µmol/L chez ces patients.

La modulation de la neurotransmission excitatrice dépend également de la recapture des neurotransmetteurs au niveau de la région synaptique. Des rats traités 21 jours par le régime cétoène ne présentaient pas de modulation de la recapture du glutamate (Bough et al., 2007). L'expression des différents transporteurs du glutamate EAAC1, GLT-1 et GLAST n'était pas modulée au niveau de l'hippocampe, du cortex et du cervelet après un traitement par le régime cétoène.

c) GABA

L'augmentation de la teneur et/ou de la libération du GABA dans le cerveau peut être un facteur permettant le contrôle des crises épileptiques. Plusieurs études se sont intéressées à évaluer les effets du régime cétoène sur la synthèse du GABA et sur sa biodisponibilité. Dans une étude *in vitro*, l'application de corps cétoniques tels que le BHB ou l'ACA (5 mM) dans le milieu de culture augmentait la teneur en GABA des synaptosomes (Erecinska et al., 1996). Dans cette étude, il était également retrouvé, une augmentation de la concentration en glutamate, une diminution de la transamination du glutamate en aspartate et une augmentation de l'activité enzymatique de l'acide glutamique décarboxylase (GAD) qui transforme le glutamate en GABA. Les auteurs formulaient donc l'hypothèse que l'augmentation du GABA dans les synaptosomes était liée à la diminution de la transamination du glutamate en aspartate et à l'augmentation de l'activité de la GAD.

Dans une étude *in vivo*, il était observé que chez des rats soumis à une restriction alimentaire pendant sept jours (alimentation normale ou régime cétoène) l'expression de la GAD augmentait (Cheng et al., 2004). Les ARNm ainsi que l'immunoréactivité des sous-unités 65 et 67 étaient augmentés notamment dans le cortex des animaux. Même si ces résultats sont en faveur d'une augmentation de la concentration en GABA au niveau cérébral, une action propre du régime cétoène n'était pas observée dans cette étude. Les études *in vivo* ne rapportaient pas d'augmentation de la concentration en GABA au niveau cérébral que ce soit chez des souris (25-30 g) ayant reçu un régime cétoène pendant trois jours ou chez des rats (cinq mois) spontanément épileptique (GAERS) ayant reçu le régime cétoène pendant 21 jours (Melo et al., 2006;Yudkoff et al., 2001). Ces études rapportaient un changement du métabolisme des acides aminés au niveau cérébral. Il y avait une augmentation du métabolisme des astrocytes et les acides aminés étaient principalement synthétisés à partir de l'acétate (Melo et al., 2006;Yudkoff et al., 2001;Yudkoff et al., 2005). Cette évaluation était réalisée grâce à l'injection d'isotopes du glucose ou de l'acétate marqués au carbone 13. Mais l'ensemble de ces adaptations ne conduisait pas à moduler la concentration en GABA au niveau cérébral chez des rats ou des souris traités par le régime cétoène. Seul une étude

rapportait une augmentation de la concentration en GABA cérébral lorsque l'isotope de l'acétate, marqué au carbone 13 était administré avec des donneurs d'azote tels que la leucine, ou l'alanine (Yudkoff et al., 2005).

A l'inverse des résultats obtenus chez les rongeurs, une étude clinique humaine rapportait une augmentation significative de la concentration en GABA dans le liquide céphalorachidien des patients (n=17) qui répondaient au régime cétogène (diminution de la fréquence des crises épileptiques > 50 %). Après quatre mois de traitement, la concentration de GABA était de 4,20 +/- 1,17 µmol/L chez les patients qui répondaient au traitement et de 2,79 +/- 1,3 µmol/L chez les patients qui ne répondaient pas, pour des concentrations basales en GABA de 3,75 +/- 1,6 µmol/L et de 2,55 +/- 1,2 µmol/L. Les patients (n=7) qui répondaient très bien au régime cétogène (diminution de la fréquence des crises épileptiques > 90 %) présentaient une augmentation plus prononcée du GABA dans le liquide céphalorachidien (Dahlin et al., 2005). Mais ces patients présentaient un niveau basal en GABA supérieur aux autres patients. Dans cette étude, l'augmentation de la concentration en GABA était favorisée chez les jeunes patients (âge < 5,5 ans). La quantité de GABA cérébrale était analysée par spectroscopie (NMR) chez trois enfants présentant une épilepsie pharmacorésistante (Wang et al., 2003). Deux des enfants présentaient un faible niveau basal en GABA ($1,22 * 10^4$ et $1,66 * 10^4$ unités arbitraires) qui augmentait ou se maintenait trois mois après l'introduction du régime cétogène ($1,64 * 10^4$ et $1,41 * 10^4$). Chez le troisième patient, une diminution de la concentration en GABA était retrouvée après trois mois de traitement par le régime cétogène (passage de $7,1 * 10^3$ à $1,36 * 10^4$). Finalement, chez huit adultes sains et volontaires, une augmentation de l'inhibition corticale de type GABA_A était retrouvée après deux semaines de traitement par le régime cétogène (Cantello et al., 2007). Les sujets recevaient un régime cétogène de ratio 4/1. Un enregistrement EEG associé à une stimulation magnétique transcrânienne était effectué avant l'introduction du régime cétogène, puis après 8 et 14 jours de traitement. Un enregistrement était effectué trois mois après l'arrêt du régime cétogène. Chez les huit sujets, après 14 jours de traitement par le régime cétogène, il était retrouvé une augmentation de l'inhibition corticale de courte latence et une augmentation de l'activité bêta dans les régions périrolandiques. Ces modifications sont le reflet de l'augmentation de l'activité de type GABA_A et donc le reflet d'une diminution de l'excitabilité corticale chez ces sujets. En revanche, huit jours après l'introduction et trois mois après l'arrêt du régime cétogène, ces modifications n'étaient pas retrouvées.

3) Changement de métabolisme énergétique

Un traitement par le régime cétoène conduit à une augmentation de la production de corps cétoniques. Ces corps cétoniques sont utilisés par certains organes, dont le cerveau comme source d'énergie. Le changement de substrat énergétique et/ou les changements du métabolisme pourraient être responsables des effets anticonvulsivants du régime cétoène.

a) Effet de l'inhibition de la glycolyse

Le traitement par le régime cétoène induit des changements métaboliques. Les deux changements majeurs sont l'utilisation des corps cétoniques comme source d'énergie, et l'inhibition de la glycolyse. Ce changement de substrat énergétique au niveau cérébral pourrait être impliqué dans les propriétés anticonvulsivantes du régime cétoène. En faveur de cette observation, l'inhibition de la glycolyse suite à l'administration du 2-deoxyglucose (2-DG [inhibiteur de la glucose phosphatase isomérase], 250 mg/kg, i.p.) augmentait le seuil électrique d'apparition des crises épileptiques au cours du « kindling » électrique chez des rats (Garriga-Canut et al., 2006). L'administration du 2-DG, 30 minutes avant la stimulation électrique conduisait à augmenter le nombre de décharges électriques pour obtenir des crises épileptiques de stade III, IV ou V. Chez les animaux ayant reçu une injection de 2-DG avant la stimulation électrique, la durée totale des crises (stade \leq IV) pour obtenir une crise épileptique de stade V augmentait. Le 2-DG retardait la progression des crises épileptiques dans un modèle de « kindling » électrique. Les propriétés anticonvulsivantes du 2-DG (0,25 et 0,5 g/kg, i.p.) et du fructose 1,6 bisphosphate (F16BP, 0,25-0,5 et 1 g/kg, i.p.) étaient évaluées suite à l'induction de crises épileptiques par le PTZ (50 mg/kg, i.p.), le kaïnate (10 mg/kg, i.p.) et la pilocarpine (300 mg/kg, i.p.) chez des rats (Lian et al., 2007). Le F16BP active la voie des pentoses phosphates et inhibe indirectement la glycolyse. L'administration de 2-DG une heure avant la pilocarpine (0,25 g/kg, i.p.) réduisait la sévérité et la durée des crises épileptiques. Le F16BP avait le même effet sur la sévérité et la durée des crises épileptiques, mais cet effet était dose-dépendant. Toujours dans ce modèle, l'administration de lactate (0,5 g/kg, i.p.) 30 minutes après le F16BP et le 2-DG conduisait à diminuer les effets anticonvulsivants du F16BP et à inhiber ceux du 2-DG. Pour les crises épileptiques induites par le kaïnate, le 2-DG (0,25 et 0,5 g/kg, i.p.) retardait l'apparition du premier « ébrouement » des rats, mais n'avait pas d'effet sur la durée et la sévérité des crises épileptiques. Le F16BP avait un effet dose-dépendant : la posologie de 0,25 g/kg était inefficace, et la posologie de 0,5 g/kg augmentait la latence d'apparition et diminuait la sévérité et la durée des crises épileptiques. Finalement pour les crises induites par le PTZ, une administration de 2-DG (0,25 g/kg) réduisait la durée

des crises épileptiques sans modifier la latence d'apparition ni la sévérité. Le F16BP augmentait la latence d'apparition des crises épileptiques et diminuait la durée de celles-ci de façon dose-dépendant.

b) Modifications du métabolisme énergétique

Des rats traités trois semaines par le régime cétogène présentait une augmentation de l'expression des gènes liés au métabolisme : énergétique (34 gènes), lipidique (17 gènes) et protéique [34 gènes] (Bough et al., 2006). Les auteurs retrouvaient également une diminution de l'expression de 23 gènes sur 39 codant des protéines impliquées dans la transmission synaptique ou codant des sous-unités de canaux ioniques (récepteurs AMPA, récepteurs métabotropiques au glutamate, transporteur du glutamate EAAC1, canaux : au chlore [ClCN1], au potassium [KCNN2], au sodium [SCN1a], au calcium [α -4 et α -1-D]...). Les gènes liés au métabolisme énergétique qui étaient augmentés codaient des protéines impliquées dans le cycle de Krebs, la phosphorylation oxydative et la glycolyse. Mais les activités enzymatiques de la glycolyse et du cycle de Krebs n'étaient pas modifiées par le régime cétogène lors d'une mesure *in vitro*. Les auteurs expliquaient cette absence de modification de l'activité enzymatique *in vitro*, par le fait que l'augmentation des transcrits était modeste (< 35 %). Les modifications de l'expression génique suite à un traitement par le régime cétogène affectaient l'ensemble des cellules hippocampiques. Les animaux présentaient également une augmentation de 46 % de la biogenèse des mitochondries dans les neurones hippocampiques et une augmentation de la capacité énergétique (augmentation du ratio phosphocréatine / créatine et des concentrations en glutamate et en glutamine). L'augmentation de la capacité énergétique au cours d'un traitement par le régime cétogène était également retrouvée dans des précédentes études *in vivo* ou clinique (DeVivo et al., 1978; Pan et al., 1999). L'augmentation de la capacité énergétique pourrait permettre de stabiliser la transmission synaptique en situation pathologique (Bough et al., 2006). En effet, les auteurs évaluaient grâce à des tranches hippocampiques, les effets du régime cétogène sur la genèse des potentiels post-synaptiques excitateurs suite à une stimulation électrique. Lorsque le glucose contenu dans le milieu de culture était diminué (de 10 μ M à 2 μ M) les neurones du gyrus denté présentaient une diminution de l'émission de potentiels post-synaptiques excitateurs de 27 % pour les animaux traités par le régime cétogène et de 53 % pour les animaux témoins. L'augmentation des capacités énergétiques cellulaires contribuerait à stabiliser la transmission synaptique en situation pathologique. L'augmentation des capacités énergétiques pourrait également conduire à une augmentation de la concentration extracellulaire en adénosine. L'action de l'adénosine sur ses récepteurs métabotropiques de type A1 permettrait de diminuer la libération de glutamate au niveau pré-synaptique et/ou à

diminuer l'excitabilité cellulaire de la région post-synaptique (Masino and Geiger, 2008). L'augmentation des quantités d'ADP (adénosine diphosphate) peut conduire à l'activation des canaux K_{ATP} . Les canaux K_{ATP} ont la particularité de faire le lien entre le métabolisme et l'excitabilité cellulaire. L'ouverture de ces canaux conduit à une sortie de potassium ce qui favorise une repolarisation cellulaire. Au niveau cérébral, les canaux K_{ATP} sont exprimés par les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes dans l'hippocampe, l'hypothalamus et la substance noire. L'activation des canaux K_{ATP} par l'ADP induit une repolarisation et/ou une hyperpolarisation cellulaire, ce qui est en faveur d'une diminution de l'excitabilité cérébrale (Vamecq et al., 2005). L'activation de ces canaux peut également être modulée par les acides gras à longue chaîne et les corps cétoniques (Ma et al., 2007; Vamecq et al., 2005).

4) Actions neuroprotectrices du régime cétogène

Le régime cétogène a des propriétés neuroprotectrices (diminution de la mort cellulaire et prévention du stress oxydant). Certaines études suggèrent que l'action antiépileptique du régime cétogène est liée à son action neuroprotectrice. Mais cette notion reste floue et peu développée dans la littérature. Dans cette partie, nous aborderons succinctement les propriétés neuroprotectrices du régime cétogène mais cette hypothèse ne sera pas retenue dans la suite du travail.

a) Modulation de la mort cellulaire et de la neurogenèse

Plusieurs études ont rapporté une diminution de la mort neuronale suite à un état de mal épileptique induit par le kaïnate (25 mg/kg, i.p.) chez des souris traitées par le régime cétogène (Noh et al., 2003; Noh et al., 2005a; Noh et al., 2005b; Noh et al., 2006b). Dans une autre étude il était retrouvé une augmentation de la neurogenèse (Kwon et al., 2008). Un traitement de quatre semaines par le régime cétogène inhibait la mort neuronale hippocampique induite par l'administration de kaïnate. Au niveau moléculaire et en faveur de ces résultats, il était retrouvé une séquestration du complexe 14-3-3 par la protéine Bad phosphorylée et une inhibition de la voie des caspases 3 (Noh et al., 2003; Noh et al., 2006). L'augmentation de l'expression de la calbindine-D28k suite à un traitement par régime cétogène pourrait être responsable de la diminution de la mort cellulaire. En effet, cette protéine pourrait tamponner l'augmentation du calcium intracellulaire suite à l'administration de kaïnate (Noh et al., 2005a). Après un traitement par le régime cétogène il était également retrouvé une diminution de la clusterine dans les aires CA1 et CA3 hippocampiques de souris

(Noh et al., 2005b), sans qu'une fonctionnalité n'ait pu être associée à cette variation.

Une autre étude rapportait que le régime cétogène avait un effet sur la neurogenèse. Suite à un traitement de quatre semaines par le régime cétogène, les souris ayant reçu une injection de kainate (30 mg/kg, i.p.) présentaient une augmentation de la neurogenèse mise en évidence par des injections de BrdU pendant six jours consécutifs (Kwon et al., 2008). Les auteurs suggéraient que cette augmentation de la neurogenèse pourrait expliquer l'effet bénéfique du régime cétogène dans l'épilepsie.

b) Action sur le stress oxydant

Le stress oxydant conduit à la formation de radicaux libres qui sont pris en charge par des systèmes enzymatiques antioxydants afin de détoxifier le milieu cellulaire. Une surproduction de radicaux libres et/ou une diminution de l'activité antioxydante conduit à des dommages cellulaires. Dans une étude *in vitro*, lorsque des cellules en culture (organotypique) étaient soumises à un état de mal épileptique prolongé (induit par une stimulation électrique de 2 heures) la production de radicaux libres augmentait ainsi que les dommages cellulaires. L'ajout d'un agent antioxydant dans le milieu de culture (alpha-trocoferol) diminuait les dommages cellulaires (Kovacs et al., 2002). Dans un modèle *in vivo* un traitement de sept jours par la vitamine E (alpha trocoferol ; 25, 75 ou 225 mg/kg, i.p.) avait une action antiépileptique. Un tel traitement induisait une diminution du nombre d'épisodes convulsifs induits par une injection d'acide méthylmalonique (MMA, 6 µmol/ 2 µL) ou de PTZ (3,26 µmol/ 2 µL) dans le striatum, et une diminution de leurs durées (Ribeiro et al., 2005). Cette action était dose-dépendante. Les effets antiépileptiques de la vitamine E étaient également associés à une diminution de la production de substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique, un marqueur du stress oxydant. Ainsi, l'action neuroprotectrice du régime cétogène via une action antioxydante a été envisagée.

Dans une étude *in vitro*, l'application de corps cétoniques (BHB + ACA) conduisait à protéger des cellules neuronales de rats lors de l'application de glutamate (10 µM) dans le milieu de culture (Maalouf et al., 2007). L'application de 1 mM de BHB et de 1 mM d'ACA augmentait le ratio $NAD^+ / NADH$ et la respiration mitochondriale, ce qui conduisait à limiter la production de radicaux libres et à diminuer la mort neuronale excitotoxique liée à l'application de glutamate. Des résultats similaires étaient rapportés dans une autre étude (Noh et al., 2006a). Un prétraitement (24 heures) de cellules hippocampiques de souris (HT22) par du BHB (4 µM) ou de l'ACA (5 µM) réduisait la mort cellulaire induite par l'application de glutamate (5 mM). Les effets étaient plus marqués avec l'ACA, qui réduisait la production de

radicaux libres jusqu'à 12 heures après l'application de glutamate.

Dans les études *in vivo*, une augmentation du pouvoir antioxydant est rapportée chez les animaux traités par le régime cétogène. Une étude rapportait une augmentation des protéines mitochondriales UCP2, UCP4 et UCP5 (uncoupling proteins) dans l'hippocampe de jeunes souris (21 jours) traitées 10 à 12 jours par le régime cétogène (Sullivan et al., 2004). Il était également retrouvé chez ces souris une diminution de la production de radicaux libres suite à l'application d'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase) sur des mitochondries isolées. Ces résultats sont en faveur d'un meilleur pouvoir antioxydant chez les animaux ayant reçu le régime cétogène. Deux autres études rapportaient une augmentation du pouvoir antioxydant suite à un traitement de trois ou de huit semaines par le régime cétogène chez des rats (Jarrett et al., 2008; Ziegler et al., 2003). Des rats traités 8 semaines par le régime cétogène présentaient une augmentation du pouvoir antioxydant dans les mitochondries hippocampiques, ainsi qu'une augmentation de 400 % de l'activité de la glutathion peroxydase (Ziegler et al., 2003). Cette augmentation était uniquement retrouvée dans l'hippocampe. En revanche, l'activité de la superoxyde dismutase n'était pas affectée. Des rats traités trois semaines par le régime cétogène présentaient une augmentation de la concentration et de la biosynthèse de glutathion dans les mitochondries (Jarrett et al., 2008). Ces variations s'accompagnaient d'une augmentation du pouvoir antioxydant des mitochondries avec une diminution de la production de radicaux libres ainsi qu'une diminution des dommages sur l'ADN suite à l'application d' H_2O_2 . En complément, l'augmentation du nombre de mitochondries à la suite d'un traitement par le régime cétogène pourrait contribuer à renforcer les effets antioxydants observés dans les précédentes études (Bough et al., 2006).

5) Rôle des acides gras poly-insaturés

Une implication des acides gras poly-insaturés (AGPI) a été suggérée. Plusieurs études rapportaient que les propriétés anticonvulsivantes du régime cétogène pourraient être portées par les AGPI. Parmi les hypothèses d'action des AGPI il y a la modulation de la fluidité membranaire, de l'activité de certains récepteurs canaux et de l'inflammation. Ces différents aspects seront abordés dans la partie suivante.

IV. Acides gras poly-insaturés

Les AGPI proviennent de l'alimentation, ou sont synthétisés de façon endogène à partir des acides gras dits essentiels. Nous verrons dans cette partie que le pouvoir anticonvulsivant des AGPI a été évalué dans plusieurs études cliniques, mais aussi dans des modèles *in vitro* et *in vivo*.

1) Généralités sur les acides gras poly-insaturés

Les lipides alimentaires contiennent une grande variété d'acides gras. La famille des lipides est composée de trois groupes : les acides gras saturés, mono-insaturés et poly-insaturés. Cette distinction se fait par leurs caractéristiques chimiques, à savoir le nombre de double liaison. Les AGPI se répartissent en différentes familles (oméga-3 [n-3], oméga-6 [n-6], oméga-9 [n-9]) définies par la position de la première double liaison à l'extrémité méthyle-terminale de leur précurseur. Dans ce travail, nous nous intéresserons plus particulièrement aux AGPI des séries n-3 et n-6 dont les chefs de file sont respectivement l'acide alpha linoléique (ALA) et l'acide linoléique (LA).

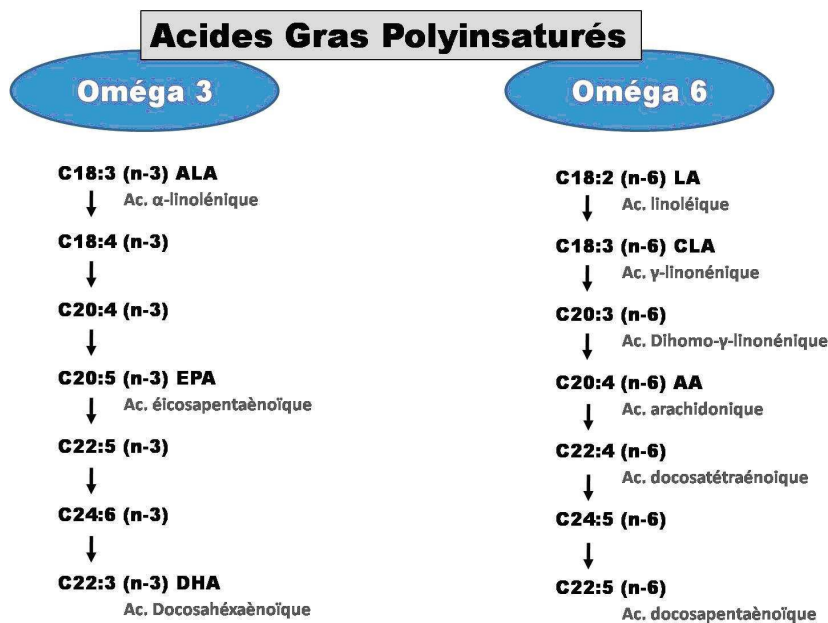
Les AGPI sont les précurseurs de la synthèse de médiateurs bioactifs comme les eicosanoïdes et les docosanoïdes. Ils ont aussi un rôle structural car ils sont incorporés dans les membranes cellulaires sous forme de phospholipides. Les chaînes d'acyl gras poly-insaturées jouent un rôle dans le maintien de l'intégrité structurale des membranes neuronales (Bourre et al., 1991). La composition en phospholipides membranaires est dépendante des apports alimentaires en AGPI (Haag, 2003). Les données expérimentales utilisant les modèles *in vitro* et *in vivo* suggèrent que les AGPI ont des propriétés antiépileptiques. Mais avant d'aborder ce point nous présenterons succinctement les principaux AGPI n-6 (LA et AA) et n-3 (ALA, EPA et DHA).

2) L'acide linoléique (LA) et l'acide alpha linoléique (ALA)

L'acide linoléique (LA, C18 :2 n-6) et l'acide alpha linoléique (ALA, C18 :3 n-3) sont dits essentiels car ils ne peuvent pas être synthétisés par les mammifères qui ne possèdent pas les enzymes nécessaires à leur synthèse ($\Delta 12$ et $\Delta 15$ desaturase). Ces deux acides gras sont apportés uniquement par l'alimentation. L'ALA et le LA peuvent être synthétisés par les plantes qui représentent donc la meilleure source d'apport.

Par une succession de désaturations et d'élongations, l'ALA et le LA sont métabolisés en acides gras poly-insaturés à 20 et 22 carbones. Les métabolites les plus importants sont l'acide arachidonique (AA) pour le LA, l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahéaénoïque (DHA) pour l'ALA (Figure 3).

Figure 3: Métabolisme des acides gras poly-insaturés des séries oméga-3 (n-3) et oméga-6 (n-6).



N.PORTA

3) L'acide arachidonique (AA) et ses métabolites

L'AA (C20 :4 n-6) est synthétisé à partir du LA et, il est principalement intégré dans les phospholipides membranaires. Le métabolisme de l'AA repose sur l'activation de phospholipases qui le libère des phospholipides membranaires. L'AA ainsi libéré peut être oxydé selon deux voies métaboliques principales qui sont présentées figure 4.

La première voie est la voie des cyclo-oxygénases (COX). Cette voie conduit à la synthèse des prostaglandines (PG), thromboxanes et des prostacyclines. Elle fait intervenir deux types d'enzymes, la cyclo-oxygénase 1 qui est constitutive et qui s'exprime dans presque tous les tissus et la cyclo-oxygénase 2 qui est inductible et dont la synthèse peut être amplifiée par des médiateurs de l'inflammation. La deuxième voie met en jeu divers enzymes dont la 5-lipo-oxygénase (LOX) pour produire les leucotriènes [LT] (DuBois et al., 1998). Il existe une

troisième voie : la voie du cytochrome P450 qui mène à la production de EET (acide epoxyeicosatriénoïque) et de HETE (acide hydroxyeicosatétrénoïque).

Tous les dérivés eicosanoïdes (séries 2 et 4) de l'AA dont les prostaglandines, les thromboxanes, les prostacyclines, et les leucotriènes sont des molécules pro-inflammatoires. Les leucotriènes qui dérivent de l'AA ont notamment la capacité d'induire une augmentation de la production du facteur nécrosant de tumeur alpha (TNF-alpha) et d'interleukines pro-inflammatoires [IL1 et IL6] (Calder, 2005;Calder, 2006).

4) L'acide eicosapentaénoïque (EPA) et ses métabolites

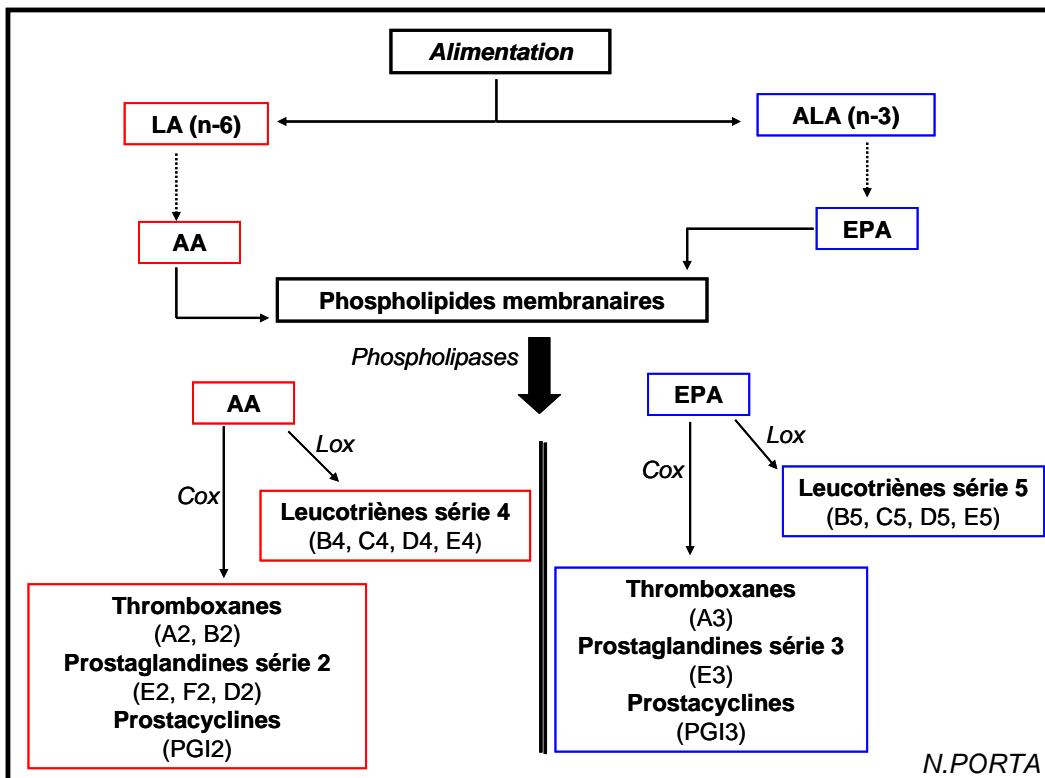
L'EPA (C20 :5 n-3) est synthétisé à partir de l'ALA. Comme l'AA, il est intégré dans les phospholipides membranaires et il est libéré par des phospholipases. L'EPA libéré est alors dirigé vers les mêmes voies d'oxydation que l'AA. Ces deux AGPI entrent en compétition. L'EPA est utilisé en priorité et son oxydation conduit à la formation des eicosanoïdes suivants : le thromboxane A3, la prostacycline PGI3, les prostaglandines E3 et les leucotriènes B5 (Figure 4). Ces eicosanoïdes possèdent une faible activité inflammatoire (Calder, 2005;Calder, 2006).

5) L'acide docosohexaénoïque (DHA) et ses métabolites

Le DHA (C22 :3 n-3) est synthétisé à partir de l'ALA. Il est ensuite incorporé dans les membranes cellulaires sous forme de phospholipides. C'est un composant majoritaire dans le système nerveux central où 30 % de DHA est incorporé dans les phospholipides membranaires pour 15 % d'AA (Tinoco, 1982). Il peut être libéré des phospholipides membranaires par l'action des phospholipases. Le DHA libéré est alors transformé (comme l'AA et l'EPA) par les COX et les LOX. L'oxydation du DHA via ces deux voies conduit à la formation de docosanoïdes de la série D-resolvines (docosatriènes, neuroprotectines...). Ces molécules ont une forte capacité anti-inflammatoire et peuvent réguler la production de l'IL1-bêta par leur action sur le facteur NFkB (Calder, 2005;Hong et al., 2003;Marcheselli et al., 2003).

N.B : Ces AGPI (AA, EPA et DHA) une fois libérés par les phospholipases peuvent aussi être orientés vers la bêta-oxydation mitochondriale ou recapturés dans le réticulum endoplasmique.

Figure 4 : Biosynthèse des eicosanoïdes à partir de l'acide arachidonique (AA) et de l'acide eicosapentaénoïque (EPA). [COX : cyclo-oxygénases ; LOX : lipo-oxygénase]



DONNEES CLINIQUES

Trois études cliniques (Bromfield et al., 2008; Schlanger et al., 2002; Yuen et al., 2005) se sont intéressées à l'effet anticonvulsivant des AGPI. L'apport entérale d'AGPI dans ces études se faisait principalement avec des AGPI n-3. Ces études ne sont pas homogènes sur le plan méthodologie et méritent d'être analysées plus précisément.

1) Etudes cliniques

Dans un essai ouvert, 21 patients avec une épilepsie pharmacorésistante étaient inclus (Schlanger et al., 2002). L'alimentation de ces patients était complétée durant 6 mois par l'administration quotidienne de 3,25 g d'AGPI n-3 (46 % DHA ; 18 % EPA ; 1 % ALA) contenu dans du pain. Seul 5 patients sur 21 terminaient l'étude car 16 patients refusaient de manger

le pain contenant les AGPI. Ces cinq patients présentaient tous une diminution de la fréquence et de la sévérité des crises d'épilepsie.

Une étude randomisée en double aveugle contre placebo (huile minérale) a inclus 56 patients pharmacorésistants (29 traités et 27 placebos). Le groupe traité recevait quotidiennement 1 g d'EPA et 0,7 g DHA. La fréquence des crises d'épilepsie était réduite de 50 % chez le groupe traité durant les 6 premières semaines du traitement, mais l'effet n'était pas maintenu dans le temps à l'issue de l'essai [12 semaines] (Yuen et al., 2005). En revanche, dans un essai avec une méthodologie similaire, les patients du groupe traité recevaient quotidiennement un mélange EPA / DHA 2,2 mg/jour (3/2). Sur les 21 patients (12 traités et 9 placebos), aucun patient traité par le mélange d'AGPI ne présentait une diminution de la fréquence des crises d'épilepsie, tandis que deux patients du groupe placebo présentaient une diminution de la fréquence des crises d'épilepsie (Bromfield et al., 2008).

Les informations apportées par ces études cliniques ne permettent pas de conclure quant à l'existence ou pas de propriétés anticonvulsivantes portées par les AGPI. Dans les deux derniers essais présentés, qui ont été conduits en aveugle avec randomisation et contre placebo, les quantités de lipides (EPA et DHA) apportées sont variables d'une étude à l'autre (1,7 g/jour versus 2,2 mg/jour). De plus, les apports lipidiques alimentaires n'étaient ni évalués ni contrôlés. Seul une étude sur les deux rapportait le dosage des AGPI plasmatiques (acides gras totaux et PC erythrocytaires). Aucune des études ne rapportait d'évaluation biochimique régulière, ni d'évaluation du statut nutritionnel des patients. Tous ces facteurs peuvent constituer des biais dans ces études.

2) Comparaison avec les apports du régime cétogène

Une comparaison de la quantité d'acides gras fournis par le régime cétogène et par les études cliniques sur les AGPI peut être effectuée. Le régime cétogène est établi avec un ratio de 4/1 ou 3/1. Cela signifie que 4 ou 3 g de lipides sont apportés pour 1 g de protéines et de glucides. Pour un enfant de 5 ans, les besoins caloriques sont de 80 kcal/kg/jour. Les lipides apportent donc 54 (ratio 3/1) à 72 kcal/kg/jour (4/1); ce qui correspond à 6 à 8 g/kg/jour de lipides. Dans les pays occidentaux, les produits alimentaires les plus fréquemment utilisés ne sont pas riches en AGPI. Un apport maximum de 50 % d'AGPI au cours d'un régime cétogène sera retenu. A la vue de ces données, il est possible de suggérer que les essais cliniques n'ont pas mis en évidence d'effets anticonvulsivants probants des AGPI du fait des quantités insuffisantes apportées dans les différents essais en comparaison avec le régime cétogène.

DONNEES EXPERIMENTALES

Deux types de modèles ont été utilisés dans les approches expérimentales. Dans les études *in vitro*, les propriétés anticonvulsivantes des AGPI étaient évaluées sur des modèles de tranches hippocampiques. Il s'agit de tranches de tissu frais, perfusées par du liquide céphalorachidien artificiel. L'intérêt de ce modèle est de pouvoir étudier une ou des cellules en respectant la connectivité neuronale de celle(s)-ci dans leur réseau cellulaire. Des électrodes sont utilisées pour enregistrer l'activité neuronale lors de stimuli électriques et/ou chimiques permettant d'étudier la genèse des potentiels d'action, la fréquence de décharge et la propagation des décharges au sein des structures hippocampiques. Les modèles *in vivo* évaluent la capacité de réduire l'intensité et/ou l'apparition de crises épileptiques qui sont induites par des stimulations chimiques (antagoniste GABAergique, irritation corticale) ou par une stimulation auditive dans un modèle génétiquement modifié de souris avec des crises épileptiques audiogènes.

1) Evaluation *in vitro*

Dans les modèles *in vitro* l'application d'AGPI n-3 conduisait à modifier l'excitabilité cellulaire. L'application extracellulaire de 20 μM d'EPA (n-3) ou de DHA (n-3) dans la région CA1, sur des tranches hippocampiques de souris, modifiait le potentiel de repos cellulaire vers une hyperpolarisation retardant la genèse et le nombre de potentiels d'action induit par une stimulation électrique (Xiao and Li, 1999). En revanche, l'EPA ne modifiait pas l'amplitude ni la durée des potentiels d'action. L'application d'EPA diminuait aussi la fréquence des potentiels d'action émis suite la stimulation électrique. Cette diminution était de 45 %. Dans cette même étude, l'application de 20 μM d'EPA ou de DHA dans la région CA3 ne modifiait pas le potentiel de repos de ces cellules, mais réduisait de 55 % la genèse des potentiels d'action spontanés. Le traitement de ces tranches hippocampiques par l'EPA (20 μM) inhibait les potentiels d'action des aires CA1 et CA3 induits par l'application de 200 μM de PTZ ou 200 μM de glutamate. Dans une autre étude, l'application de 50 ou de 100 μM de DHA dans la région CA1, sur des tranches hippocampiques de rats, réduisait l'amplitude des potentiels d'action générés en réponse à l'application de bicuculline (10 μM) ou à une déprivation en magnésium (active les récepteurs NMDA). Le potentiel de repos cellulaire n'était pas modifié par l'application de DHA (Young et al., 2000). Les résultats de ces deux études *in vitro* montraient que l'EPA et le DHA (n-3) étaient capables de diminuer l'excitabilité des neurones hippocampiques des aires CA1 et CA3.

2) Evaluation *in vivo*

Le pouvoir anticonvulsivant des AGPI semble confirmé par les données sur les modèles animaux. Dans les modèles *in vivo*, les études ont utilisé quasi exclusivement des mélanges d'AGPI avec des ratios n-3/n-6 variables ne permettant pas de conclure sur l'effet d'une série en particulier. L'administration pendant trois semaines par voie i.p., d'un mélange (SR-3, 40 mg/kg/jour) contenant du LA (n-6) et de l'ALA (n-3) [4/1] induisait une diminution de la durée des crises épileptiques et une augmentation de la latence d'apparition des crises motrices dans plusieurs modèles de crises d'épilepsie chez des rats : administrations i.p. répétées de doses infra-convulsivantes de PTZ, administration d'une dose unique convulsivante de PTZ (50 ou 100 mg/kg, i.p.), irritation corticale par l'administration en intracérébroventriculaire (i.c.v.) de FeCl₃ et chez des animaux présentant des crises audiogènes (Yehuda et al., 1994). Dans une autre étude, les effets anticonvulsivants du mélange SR-3 étaient comparés à ceux d'un antiépileptique. Chez des rats, le mélange SR-3 (40 mg/kg, i.p.) avait une efficacité anticonvulsivante comparable aux effets obtenus suite à l'administration d'un antiépileptique (carbamazépine, 30 mg/kg, i.m.). L'évaluation était réalisée suite à l'injection d'une dose convulsivante unique de PTZ [80 mg/kg, i.p.] (Rabinovitz et al., 2004). Une étude utilisant le mélange SR-3, avec un schéma expérimental similaire, ne conduisait pas aux mêmes résultats (Taha et al., 2006), mais il était rapporté un effet dose-dépendant (Taha et al., 2008a). Dans cette dernière étude les auteurs administraient pendant 21 jours le mélange SR-3 à différentes posologies (40, 200, 400 et 1000 mg/kg) à des rats. A l'issue du traitement un seuil au PTZ était réalisé par une injection i.p. (80 mg/kg). Les animaux traités par 200 mg/kg de SR-3 présentaient une augmentation de la latence pour l'apparition de la crise épileptique généralisée induite par le PTZ, sans modification de la sévérité des crises. L'efficacité anticonvulsivante du mélange SR-3 n'était pas associée à une modification des phospholipides membranaires cérébraux. Seul une augmentation des AGPI n-3 dans la fraction des acides gras totaux contenant les acides gras libres était retrouvée. L'administration du mélange aux posologies de 400 et de 1000 mg/kg se révélait toxique pour les animaux. Les rats perdaient du poids, ne mangeaient plus et étaient ballonnés. Selon les auteurs, ces effets néfastes étaient liés aux injections répétées du mélange SR-3 dans la cavité gastrointestinale.

Des acides gras ont également été utilisés de façon isolée. Ainsi, l'administration i.v. pendant 30 minutes de DHA ou d'EPA (40 µM) était responsable d'une augmentation du seuil d'apparition de l'activité épileptique induite par une stimulation corticale chez des rats (Voskuyl et al., 1998). Cet effet était maintenu 6 heures après l'injection, mais il ne persistait pas à

24 heures. Une administration de LA (40 μM , i.v.) avait des effets plus modestes que le DHA et l'EPA. Suite aux injections i.v., les taux plasmatiques d'EPA et de DHA étaient mesurés. Les concentrations maximales étaient atteintes dans les deux premières heures après l'injection. Puis les concentrations diminuaient progressivement pour atteindre leur niveau initial 6 heures après l'injection d'EPA ou de DHA. Dans une autre étude, l'administration d'ALA en i.c.v. (10 μM) induisait une diminution des crises d'épilepsie induites par l'administration de kaïnate (10 mg/kg, i.p.) chez des rats (Lauritzen et al., 2000). De plus, l'ALA (i.v., 100 nmol/kg ou i.c.v., 10 μM) avait un effet neuroprotecteur dans ce modèle, avec une diminution de l'atteinte cellulaire dans les aires hippocampiques CA1 et CA3. Il y avait 90 % de survie cellulaire dans CA1 et 95 % de survie cellulaire dans CA3, 7 jours après l'administration de kaïnate. Enfin, un apport via l'alimentation de 6 g/kg/jour de DHA ou d'EPA chez des souris ne modifiait pas les seuils des crises épileptiques induites par le PTZ (10 mg/ml, i.v.), le fluorothyl, le kaïnate (35 mg/kg, i.p.) ou par le modèle de choc électrique à 6 hertz. Dans le modèle au kaïnate, les apports alimentaires en DHA et EPA n'avaient pas d'effet neuroprotecteur (Willis et al., 2008).

Plus récemment, l'utilisation de souris transgéniques fat-1 suggère un rôle anticonvulsivant des AGPI n-3 (Taha et al., 2008b). Les souris transgéniques fat-1 sont capables de synthétiser des AGPI n-3 à partir des acides gras n-6 contenu dans l'alimentation. Ces souris présentent une augmentation de la concentration en DHA et une diminution de l'AA contenus dans les acides gras cérébraux totaux. La variation de la teneur en DHA était corrélée ($r = 0,56$) avec l'augmentation du délai d'apparition des crises d'épilepsie induites par le PTZ (50 mg/kg, s.c.).

MECANISMES PORTANT LES PROPRIETES ANTICONVULSIVANTES DES AGPI

Différentes hypothèses d'action ont été évoquées. Les AGPI pourraient agir en modifiant la fluidité membranaire, en agissant sur l'activité des canaux ioniques et/ou en modulant l'inflammation (Figure 5). Une modulation du métabolisme, des voies inflammatoires ou encore du stress oxydant est également possible via l'activation des récepteurs PPAR-alpha par les AGPI.

1) Modulation de la fluidité membranaire

La fluidité membranaire caractérise l'état physico-chimique de la bicouche lipidique qui constitue les membranes cellulaires. La membrane cellulaire doit être ni trop rigide ni trop fluide pour permettre les échanges entre les milieux intra- et extracellulaires (Janmey and Kinnunen, 2006). Le degré de fluidité membranaire est modulé par les AGPI provenant de l'alimentation, et notamment par leur incorporation dans les phospholipides membranaires et le cholestérol. La fluidité membranaire dépend du taux d'insaturation des AGPI incorporés dans les phospholipides membranaires. L'AA, l'EPA et le DHA qui sont poly-insaturés sont de puissants modulateurs de la fluidité membranaire (Yehuda et al., 1999; Youdim et al., 2000).

Les délais d'incorporation des AGPI dans les phospholipides membranaires dépendent des tissus. Mais des modifications de l'alimentation conduisent à des changements visibles à plus ou moins long terme. L'apport DHA (10 mg/jour) pendant 8 semaines chez des rats adultes (20-22 mois) induisait une augmentation de la concentration en DHA dans les tissus cérébraux (Little et al., 2007). Une étude menée chez des rats carencés en AGPI n-3 a étudié la cinétique d'incorporation du DHA dans différents tissus : plasmatique, cérébral, rétinien et hépatique (Moriguchi et al., 2001). Au niveau cérébral, après deux semaines d'apport en AGPI n-3 les rats présentaient une augmentation de 35 % de la teneur en DHA. Une modification complète était retrouvée après 8 semaines de traitement pour le cerveau et la rétine. En ce qui concerne le plasma, une augmentation de 100 % de la teneur en DHA était obtenue après deux semaines d'apport en AGPI n-3. Il en était de même pour le foie. Il était également décrit qu'au niveau cérébral, les variations de la composition en AGPI contenus dans les phospholipides dépendaient essentiellement de l'apport en acides gras libres et de réactions d'estérification et de déstérifications. Seul 4 % des phospholipides cérébraux proviennent des phospholipides plasmatiques (Rapoport, 2003).

Une modification de la fluidité membranaire par la fraction d'acides gras libres ou encore par un changement de la composition en phospholipides peut conduire à des changements fonctionnels de protéines telles que des enzymes, des récepteurs ou des canaux ioniques. Les hypothèses d'action soulevées sont une modification des interactions protéiques, une modification de la conformation des protéines transmembranaires, une modification de l'accessibilité des sites de liaisons des substrats (Fernstrom, 1999; Yehuda et al., 1999; Youdim et al., 2000). Comme nous l'avons décrit précédemment, l'application d'AGPI (EPA, DHA) sur des tranches hippocampiques conduisait à moduler l'excitabilité neuronale (Xiao and Li, 1999; Young et al., 2000). Ces effets pourraient être liés à l'action des AGPI sur

la fluidité membranaire ce qui conduirait à modifier l'activité de canaux ioniques (Poling et al., 1996;Vreugdenhil et al., 1996;Xiao et al., 1995;Xiao et al., 1997). Cet aspect sera plus précisément abordé dans la partie suivante.

2) Modulation des canaux ioniques

a) Canaux sodiques et calciques

L'application d'AGPI sur des cellules cérébrales modulait les flux ioniques à travers certains canaux, modifiant ainsi l'excitabilité cellulaire. L'application de DHA ou d'EPA sur des neurones isolés de CA1 modulait les courants entrants calciques et sodiques des canaux voltage-dépendant (Vreugdenhil et al., 1996). Ces modifications n'étaient pas retrouvées lors de l'application de LA (n-6). L'application de 16 μM de DHA ou d'EPA (n-3) n'affectait pas les seuils d'activation de ces canaux voltage-dépendant mais induisait une inactivation des canaux plus rapide. Les conductances des ions calciques et sodiques étaient ainsi diminuées respectivement de 27 et 33 %. Une telle modulation des courants ioniques sodiques et calciques était également retrouvée lors de l'application d'AGPI sur des myocytes. L'application de DHA, d'EPA ou d'ALA (5 ou 10 μM) sur des myocytes (cellules excitables) conduisait à inhiber de façon transitoire et réversible les courants entrants sodiques induits par une dépolarisation (respectivement 66 %, 64 % et 71 % d'inhibition pour 10 μM de DHA, d'EPA ou d'ALA). Les mêmes effets, mais moins marqués (44 %) étaient obtenus lors de l'application de 5 ou 10 μM d'AA (Xiao et al., 1995). L'application extracellulaire d'AGPI n-3 (DHA, EPA, ALA) et n-6 (LA et AA) sur des myocytes conduisait également à diminuer de façon réversible les courants entrants calciques (Xiao et al., 1997). Dans cette étude, l'application de 5 μM d'EPA, de DHA ou d'ALA conduisait à inhiber respectivement 83 %, 62 % et 77 % du courant calcique entrant. L'application de 5 μM d'AA ou de LA inhibait 76 % du courant calcique entrant.

Dans ces études menées sur des cellules excitables neuronales ou cardiaques, l'application d'AGPI n-3 conduisait à diminuer l'excitabilité cellulaire via une action sur les courants ioniques entrants calciques et sodiques. Il est plus difficile de conclure sur les effets des AGPI n-6 car selon les études les effets retrouvés n'étaient pas les mêmes. Même si ces résultats sont en faveur d'une action anticonvulsivante des AGPI n-3, ils doivent être considérés avec précaution puisque l'évaluation de l'action de ces AGPI se faisait uniquement à l'échelle cellulaire. A l'opposé de ces résultats, une étude menée *in vivo* rapportait l'absence

d'efficacité anticonvulsivante d'un traitement de 21 jours par des AGPI n-3 (EPA et DHA) chez des rats.

b) Canaux potassiques

Les AGPI peuvent également moduler l'activité des canaux potassiques voltage-dépendant qui sont impliqués dans la repolarisation cellulaire. Les résultats diffèrent selon les études et selon le type de canaux potassiques impliqués. L'application extracellulaire de DHA ou d'AA (0,02 à 50 μM) sur des neurones de néocortex de rats inhibait de façon dose-dépendante les courants potassiques sortants induits par une dépolarisation (Poling et al., 1996). Les effets inhibiteurs du DHA et de l'AA étaient rapidement neutralisés (2 secondes) par l'application de sérum albumine bovine qui fixait les AGPI. Ce résultat est en faveur d'une modulation de ces canaux ioniques par les AGPI libres. L'effet de l'application de DHA était étudié plus en détail sur des cellules exprimant les canaux Kv1.2. L'action inhibitrice du DHA sur ces canaux était zinc dépendante et l'action du DHA se faisait au niveau extracellulaire. Les auteurs suggéraient que le DHA était un messenger local capable d'interagir avec certains domaines extracellulaires des canaux potassiques. Dans une autre étude, l'application d'AA (1 à 10 μM) inhibait de façon dose-dépendante les courants sortants potassiques transitoires dans les neurones pyramidaux de CA1 et dans les interneurons inhibiteurs du *stratum oriens-alveus* via une augmentation de la durée d'inactivation (Keros and McBain, 1997). En revanche, l'application d'AA ne modifiait pas le seuil d'inactivation des canaux potassiques. L'application d'un analogue de l'AA non métabolisable (ETYA 1 à 10 μM) induisait les mêmes effets que l'application d'AA. Cette expérience permettait de mettre en évidence que l'action de l'AA était directe, sans implication des dérivés eicosanoïdes issus du métabolisme de l'AA. Dans ces deux études, la modulation des courants potassiques par les AGPI n-3 ou n-6 favorisait le maintien des cellules dans un état dépolarisé.

D'autres résultats étaient en faveur de la repolarisation cellulaire. L'application de DHA (7 à 700 μM) sur des oocytes de xénopes exprimant les canaux Kv1 induisait une augmentation des courants potassiques sortants (Xu et al., 2008). Ces résultats sont en faveur d'une diminution de l'excitabilité cellulaire puisque l'augmentation de la sortie de potassium favorise la repolarisation cellulaire. Les effets maximum du DHA étaient obtenus pour des concentrations comprises entre 21 et 700 μM . Mais l'utilisation d'un AGPI unique et à de fortes concentrations n'est pas représentatif de ce qu'il se passe *in vivo*. Les auteurs ont donc choisi d'appliquer du liquide céphalorachidien provenant d'enfants (n=20) traités par le régime cétogène. L'activité des canaux Kv1 était évaluée suite à l'application de liquide céphalorachidien prélevé à l'introduction du régime cétogène (à la fin du jeûne) puis après

trois à six mois de traitement. L'activité des canaux Kv1 était modulée de façon similaire par le DHA et par le liquide céphalorachidien obtenu après quelques mois de traitement par le régime cétogène.

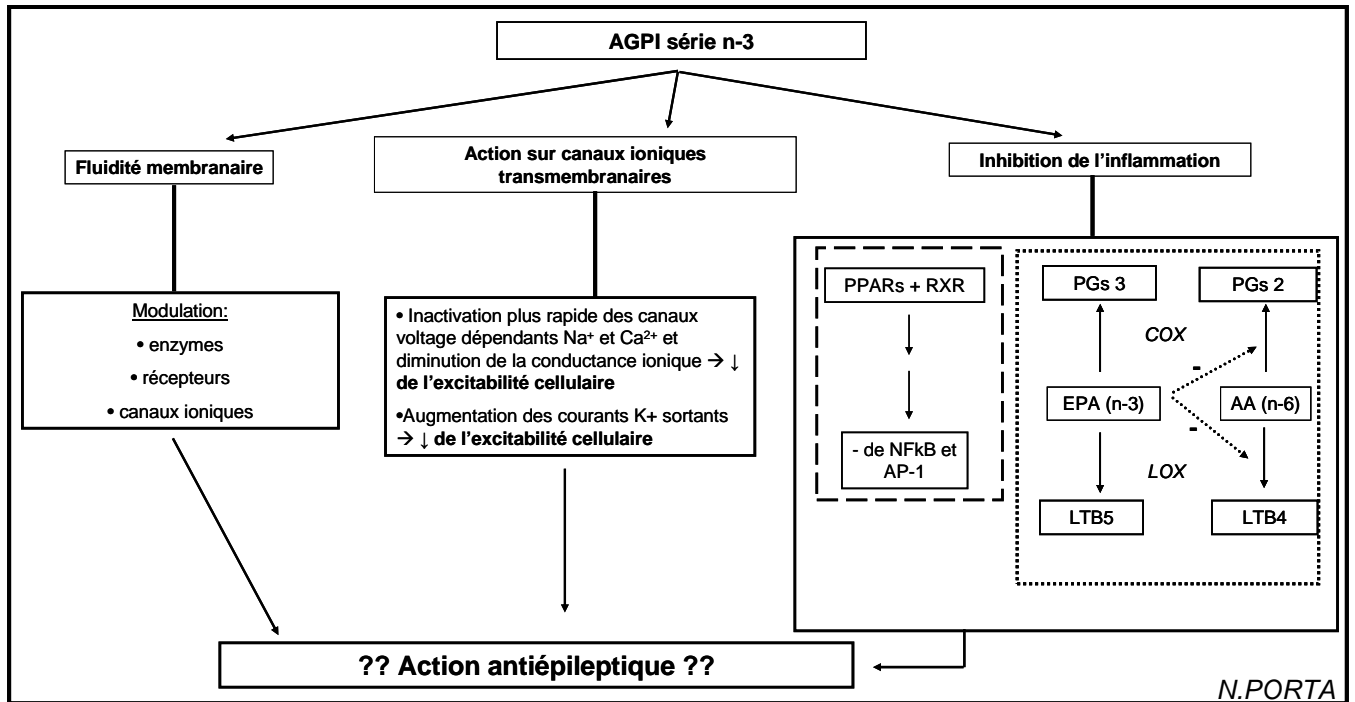
La modulation des canaux potassiques voltage-dépendant par les AGPI n-3 et n-6 semble dépendre du type cellulaire étudié ainsi que du type de canal potassique exprimé. Les effets observés sont soit en faveur d'une augmentation de l'excitabilité cellulaire, soit en faveur d'une diminution de celle-ci. Ces études rapportent des observations obtenues dans des modélisations *in vitro*. L'observation d'un phénomène à l'échelle d'une cellule isolée ne permet pas de prédire quelle sera l'action globale dans un système complexe où les cellules sont interconnectées.

3) Modulation de l'inflammation

Les données issues des études expérimentales suggèrent qu'il existe une relation de réciprocité entre crises épileptiques et cytokines. D'une part, il a été montré que les cytokines pro-inflammatoires avaient des propriétés pro-convulsivantes. D'autre part, un état de mal épileptique est responsable de l'expression cérébrale de cytokines inflammatoires comme l'IL-1 β , IL-6 et le TNF- α (Auvin and Sankar, 2008). Les AGPI n-3 possèdent des propriétés anti-inflammatoires, alors que les AGPI de type n-6 sont des précurseurs des voies pro-inflammatoires (Calder, 2006; Simopoulos, 2002). Il existe plusieurs mécanismes d'action de cette modulation inflammatoire :

- modification de la fluidité membranaire des lymphocytes T agissant sur l'activité des protéines membranaires,
- les AGPI n-3 entrent en compétition avec les AGPI n-6 comme substrats enzymatiques abaissant la quantité de molécules pro-inflammatoires telles que les prostaglandines de type 2 et des leucotriènes de type 4,
- action directe au niveau des récepteurs nucléaires PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) alpha et gamma en agissant comme rétrocontrôle sur le facteur NF κ -B (facteur nucléaire impliqué dans la synthèse des cytokines),
- action directe sur l'immunité en diminuant les cytokines et les médiateurs lipidiques pro-inflammatoires (Gottrand, 2007; Youdim et al., 2000). Les propriétés anticonvulsivantes des AGPI n-3, décrites précédemment, pourraient être liées à leurs activités de modulation de l'inflammation.

Figure 5 : Hypothèses d'action des AGPI conduisant à une action anticonvulsivante. [RXR : récepteurs à l'acide rétinoïque ; PPARs : peroxisome proliferator-activated receptors; LT : leucotriènes; PGs : prostaglandines ; COX : cyclo-oxygénases; LOX : lipo-oxygénases ; NFkB et AP-1 : facteurs de transcription]



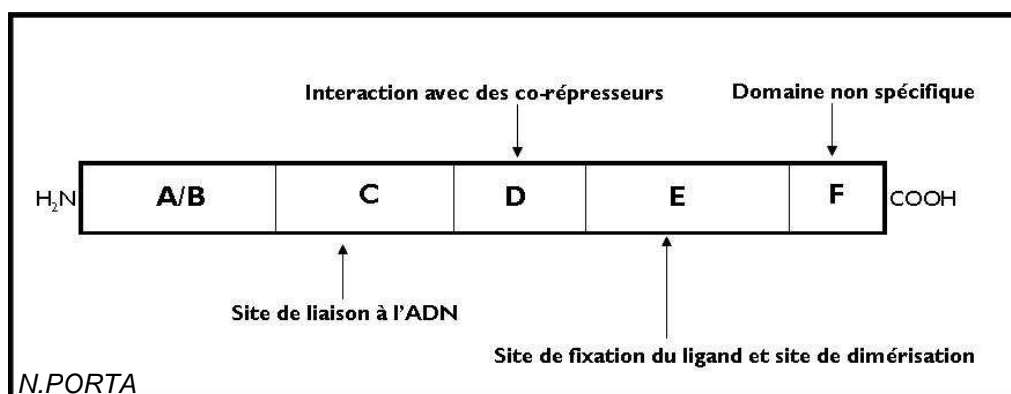
4) Les récepteurs PPAR-alpha (peroxisome proliferator-activated receptor-alpha)

Les récepteurs PPAR-alpha appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires PPARs. Chez l'Homme comme chez le rat, la souris et le xénope trois isotypes de récepteurs PPAR ont été identifiés : PPAR-alpha, PPAR-bêta/delta, PPAR-gamma. Ces trois isotypes diffèrent par leurs lieux d'expression, leurs niveaux d'expression, la nature de leurs ligands et les voies métaboliques cibles. Dans la suite du travail, nous nous focaliserons uniquement sur les récepteurs PPAR-alpha qui peuvent être activés par les AGPI et qui sont impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique et des voies inflammatoires. Ces récepteurs PPAR-alpha sont exprimés dans le cerveau [ganglions de la base, cortex, hippocampe, thalamus] (Cullingford et al., 1998; Moreno et al., 2004).

a) Structure des récepteurs PPARs

Les récepteurs PPARs sont constitués de cinq domaines fonctionnels : A/B, C, D, E et F (Figure 6). Le domaine A/B est le domaine où sont observées les plus grandes variations entre les récepteurs en termes de longueur et de séquence. Le domaine C est le domaine le plus conservé. Il est constitué de deux molécules en doigt de zinc et, ce domaine est le domaine de fixation à l'ADN (DNA-binding domain). Le domaine D est une région charnière entre les domaines C et E pouvant interagir avec des co-répresseurs, notamment lorsque le récepteur n'est pas activé. Le domaine E est le domaine de liaison au ligand (ligand-binding domain). Il permet la fixation du ligand, mais il permet également la dimérisation des récepteurs. Le domaine F n'a pas de fonction particulière identifiée.

Figure 6 : Représentation schématique du récepteur nucléaire PPAR-alpha et de ses différents domaines (A/B, C, D, E et F).



b) Agonistes des récepteurs PPAR-alpha

Les acides gras à longue chaîne tel que le DHA, l'ALA, le LA et l'AA sont des agonistes naturels des récepteurs nucléaires PPAR-alpha. Au plus la chaîne carbonée est longue au plus l'activation de PPAR-alpha est forte (DHA > EPA > AA). Les dérivés oxydés des lipides (LTB4, 8-(S)-HETE, PGJ2, 15dPGJ2) issus des voies des cyclo-oxygénases et des lipo-oxygénases, sont également des activateurs des récepteurs PPAR-alpha (Bishop-Bailey, 2000; Cullingford, 2004; Moraes et al., 2006).

Les récepteurs PPAR-alpha peuvent aussi être activés par des ligands synthétiques. Les agents pharmacologiques hypolipémiants de la famille des fibrates en font partie (ciprofibrate, clofibrate, bézafibrate, fénofibrate). Les fibrates sont utilisés en clinique pour

diminuer les taux plasmatiques de triglycérides et augmenter les taux plasmatiques de cholestérol de type HDL.

c) PPAR-alpha activés et régulations

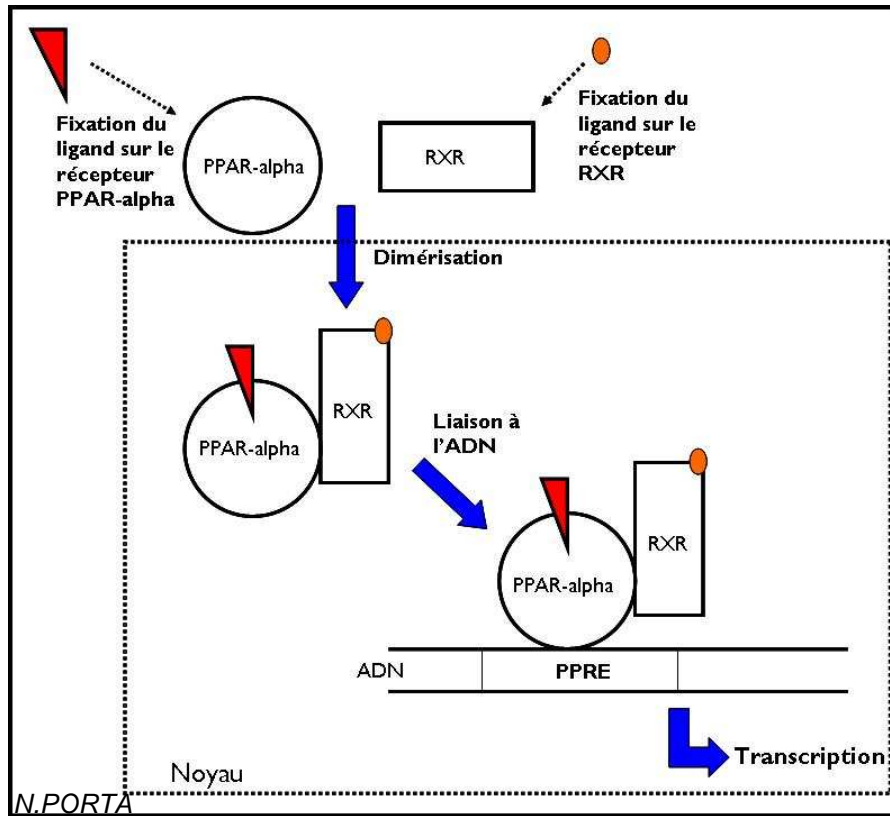
Le récepteur PPAR-alpha à l'état inactivé est un complexe lié à des éléments co-répresseurs, situé dans le cytoplasme de la cellule. Lorsque PPAR-alpha fixe un de ses ligands, les co-répresseurs sont remplacés par des éléments co-activateurs. Le récepteur PPAR-alpha activé est transloqué dans le noyau de la cellule. Il se dimérise avec le récepteur à l'acide rétinoïque (RXR-alpha, RXR-bêta ou RXR-gamma), lui-même activé par l'acide 9-cis rétinoïque. Un hétérodimère PPAR-alpha-RXR est ainsi formé. Cet hétérodimère peut alors se lier à l'ADN sur un élément réponse appelé PPAR-response Element (PPRE) constitué de deux demi-sites AGGTCA séparés par un ou deux nucléotides. Une fois ce complexe lié à l'ADN, la transcription est activée (Figure 7). Le récepteur PPAR-alpha activé par son ligand peut également réguler négativement l'expression de certains gènes par une transrépression transcriptionnelle (Figure 8).

➤ Effets transcriptionnels

La fixation du complexe PPAR-alpha-RXR sur la séquence PPRE de l'ADN permet le recrutement de co-activateurs, puis la transcription de gènes cibles (Figure 7). Parmi ces gènes sont retrouvés des gènes impliqués dans le métabolisme et l'oxydation lipidique (Ahmed et al., 2007; Barbier et al., 2002). Des souris déficientes en récepteur PPAR-alpha (KO PPAR-alpha) présentaient une accumulation anormale des acides gras au niveau hépatique et cardiaque (Leone et al., 1999). Ces souris n'étaient pas capables de dégrader les acides gras et de les transformer en corps cétoniques au cours d'un épisode de jeûne. Chez des rats, l'activation des récepteurs PPAR-alpha par le clofibrate ou par l'acide valproïque induisait une augmentation de l'expression d'une enzyme clé de la cétogenèse : la 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (mHS), dans les mitochondries hépatiques et cérébrales (Cullingford et al., 2002a). Ces effets étaient également retrouvés au niveau cardiaque quand les récepteurs PPAR-alpha étaient activés par des AGPI (Rodriguez et al., 1994).

Le complexe PPAR-alpha-RXR peut également conduire à une augmentation de l'expression d'enzymes antioxydantes dont la catalase, la superoxyde dismutase Cu/Zn, la glutathion réductase, la glutathion peroxydase favorisant ainsi le pouvoir antioxydant des cellules (Deplanque et al., 2003; Toyama et al., 2004).

Figure 7 : Le récepteur PPAR-alpha fixe son ligand (naturel ou synthétique) puis il se dimérise avec le récepteur à l'acide rétinoïque (RXR) ayant lui-même fixé son ligand (l'acide 9-cis rétinoïque). Le complexe PPAR-alpha-RXR peut alors se lier à l'ADN sur la région PPRE (PPAR-response element) et induire la transcription.

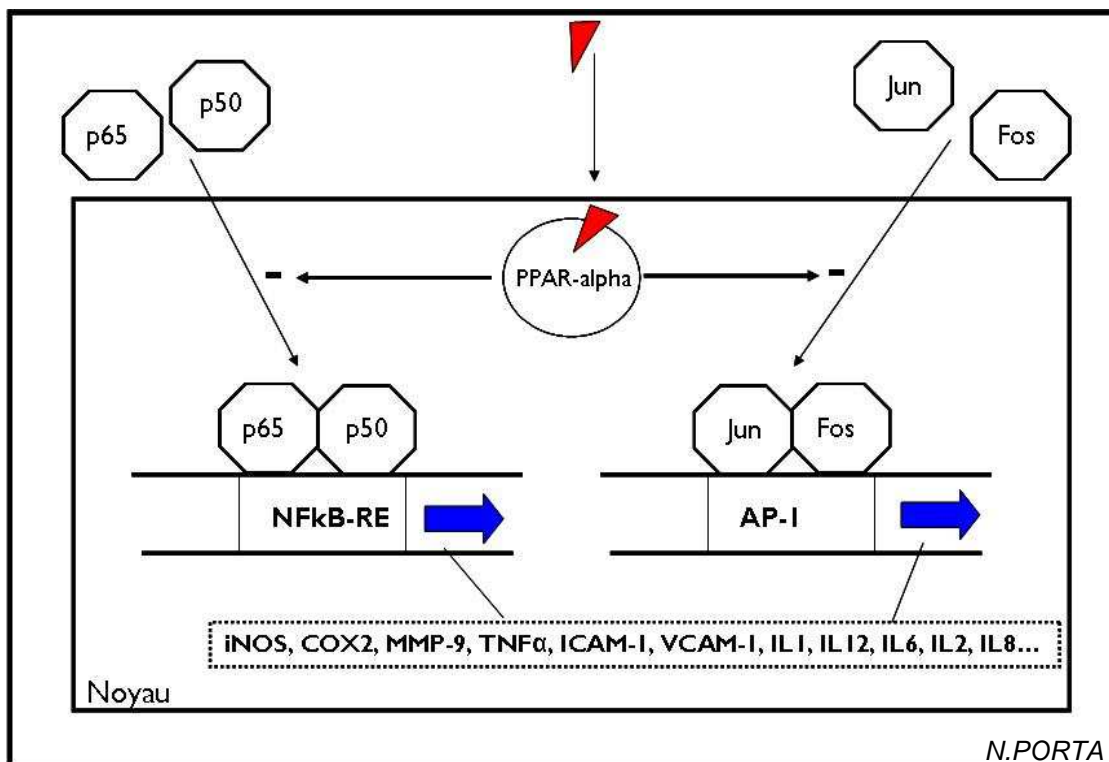


➤ Effets transrépressionnels sur les voies de l'inflammation

L'activation des récepteurs PPAR-alpha module l'inflammation (Blanquart et al., 2003; Moraes et al., 2006). Des patients traités par fibrates pour une légère hyperlipémie présentaient une diminution des concentrations plasmatiques des molécules inflammatoires telles le TNF-alpha et l'interféron-gamma (Madej et al., 1998). Tandis que des souris KO PPAR-alpha présentaient une augmentation de la réponse inflammatoire. Des souris KO PPAR-alpha traitées avec du LTB4 ou de l'AA présentaient une réponse inflammatoire exacerbée (Devchand et al., 1996) et des splénocytes isolés à partir de ces souris produisaient en excès l'IL6 et l'IL12 en réponse à l'application de lipopolysaccharide bactérien [LPS] (Poynter and Daynes, 1998). Une telle modulation de l'inflammation était également retrouvée au niveau du système nerveux central. Des souris sauvages et KO en apolipoprotéine-E traitées 14 jours par du fénofibrate présentaient une diminution des marqueurs de l'inflammation (VCAM-1, ICAM-1) suite à une ischémie cérébrale (Deplanque et al., 2003).

Ces effets de PPAR-alpha sur l'inflammation sont liés à une action de PPAR-alpha activé sur des facteurs activateurs de transcription tels que NFkB et AP-1 (Delerive et al., 1999). Cette action semble être directe, par une action négative de PPAR-alpha activé sur l'élément c-jun du complexe AP-1 et sur l'élément p65 du complexe NFkB (Figure 8). Mais PPAR-alpha activé peut également augmenter la synthèse de IκB un inhibiteur du complexe NFkB (Delerive et al., 2000).

Figure 8 : Le récepteur PPAR-alpha activé par son ligand peut inhiber la formation des complexes NFkB et AP1. La transcription de gènes impliqués dans l'inflammation ou le stress oxydant est diminuée ou inhibée. La liste présentée n'est pas exhaustive [iNOS : nitrique oxyde synthase inductible; COX2 : cyclo-oxygénase 2 ; MMP-9 : métalloprotéinase 9 ; TNF-alpha : tumor necrosis factor alpha ; ICAM-1 : intracellular adhesion molecule 1 ; VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule 1 ; IL : interleukines ; NFkB-RE : élément de réponse au facteur nucléaire NFkB].

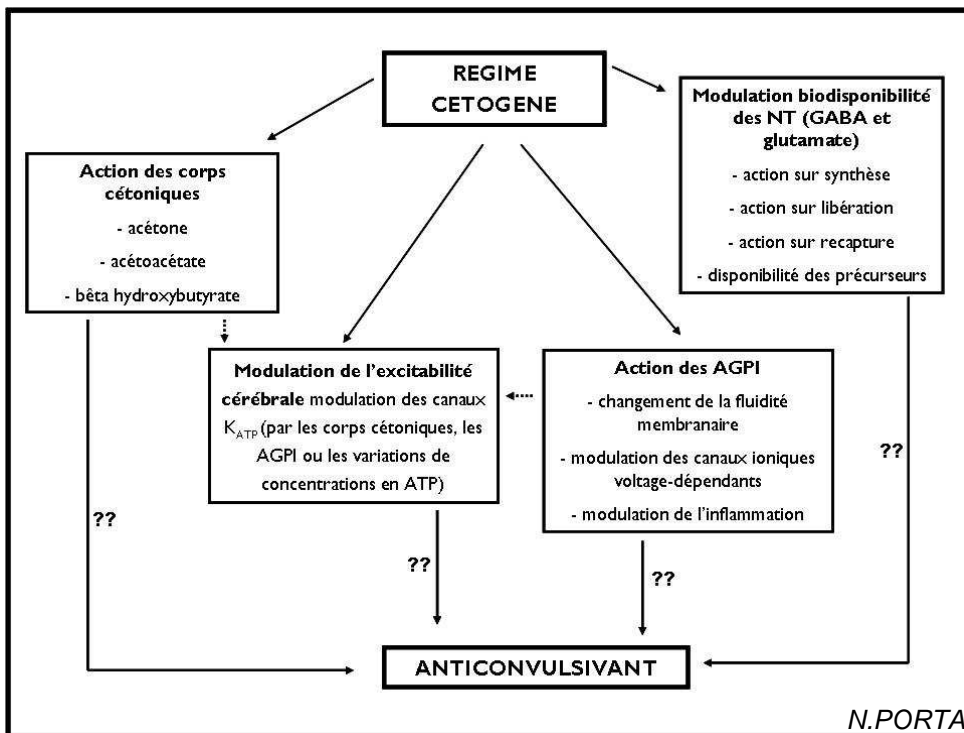


Chapitre II : hypothèses de travail

HYPOTHESES DE TRAVAIL

Dans les pages précédentes, nous avons vu que le régime cétoène est un traitement efficace dans la prise en charge des épilepsies pharmacorésistantes. Mais ce traitement est contraignant pour les patients et les familles. Nous rappelons dans la figure 9 les hypothèses physiopathologiques qui pourraient rendre compte de l'activité antiépileptique du régime cétoène. Nos méconnaissances dans ce domaine ne permettent pas à ce jour de développer de traitement de remplacement.

Figure 9 : Hypothèses d'action du régime cétoène.



Le but de ce travail est d'évaluer d'éventuelles alternatives thérapeutiques au régime cétoène. La finalité étant d'envisager des traitements moins contraignants et ayant la même efficacité. En tenant compte des probables mécanismes physiopathologiques nous avons formulé des hypothèses suivantes :

Approche expérimentale :

- (1) Un apport entérale d'AGPI pourrait avoir des propriétés anticonvulsivantes.
- (2) L'activation des récepteurs nucléaires PPAR-alpha par les AGPI ou par un agoniste synthétique (le fénofibrate) pourrait avoir des propriétés anticonvulsivantes.

Approche clinique :

- (3) Le régime cétogène pourrait être remplacé par le régime modifié d'Atkins qui est moins contraignant.

Nos objectifs étaient de répondre aux problématiques expérimentales suivantes :

- (1) Est-ce que les apports entéraux d'un mélange ALA/LA (7/2,5) ou d'un mélange LA/ALA (1,2/0,2) ont des propriétés anticonvulsivantes chez le rat ?
- (2) Est-ce que la qualité et/ou la quantité d'AGPI apportés modulent les propriétés anticonvulsivantes ?
- (3) Est-ce que ces apports entéraux en AGPI modifient le profil des AGPI contenus dans les phospholipides plasmatiques ? et ceux contenus dans les phospholipides cérébraux ?
- (4) Est-ce que des modifications des phospholipides cérébraux et/ou des phospholipides plasmatiques peuvent être associés aux propriétés anticonvulsivantes ?
- (5) Est-ce que l'activation des récepteurs nucléaires PPAR-alpha induit des propriétés anticonvulsivantes ?
- (6) Est-ce que l'action anticonvulsivante du régime cétogène et/ou des AGPI pourrait passer par l'activation des récepteurs nucléaires PPAR-alpha ?

Nos objectifs étaient de répondre aux problématiques cliniques suivantes :

- (1) Est-ce que le régime cétogène et sa forme variante le régime modifié d'Atkins possèdent la même efficacité antiépileptique?
- (2) Est-ce que les patients traités par le régime cétogène ou par le régime modifié d'Atkins présentent une variation des acides gras plasmatiques ?
- (3) Est-ce que les variations en AGPI plasmatiques peuvent être corrélées à une efficacité du traitement ?

Chapitre III : modélisation animale

MODELISATION ANIMALE

I. Etat de mal épileptique : modèle lithium-pilocarpine

Le modèle lithium-pilocarpine permet d'induire des crises épileptiques limbiques secondairement généralisées. A la suite de l'état de mal épileptique, après une phase silencieuse, les animaux deviennent épileptiques et présentent des crises épileptiques répétées spontanées.

1) Présentation du modèle

a) Action de la pilocarpine sur les récepteurs muscariniques

La pilocarpine est un agoniste cholinergique qui se lie sur les récepteurs muscariniques à l'acétylcholine (M1). Les récepteurs M1 sont des récepteurs métabotropiques, couplés à une protéine G. Au niveau cérébral, ils sont exprimés dans le cortex, l'hippocampe, l'amygdale, les ganglions de la base et le striatum (Kuhar and Yamamura, 1976). L'activation des récepteurs M1 conduit à la genèse de crises épileptiques via une libération secondaire de glutamate (Cruickshank et al., 1994).

b) Rôle du lithium

Initialement seul la pilocarpine était utilisée. Une posologie de 300 à 400 mg/kg de pilocarpine induisait des crises épileptiques prolongées chez les rats et les souris (Turski et al., 1987; Turski et al., 1983). Mais ce modèle était associé à une forte mortalité liée aux symptômes cholinergiques. La mise au point du modèle lithium-pilocarpine a permis de diminuer les posologies de pilocarpine utilisées ainsi que la mortalité associée. Les études comparatives ne rapportaient pas de différences comportementales, métaboliques, électro-encéphalographiques et neuropathologiques entre les modèles pilocarpine et lithium-pilocarpine (Clifford et al., 1987).

Une injection de lithium (3 mEq/kg) 20 heures avant l'injection de pilocarpine permettait d'utiliser la pilocarpine à une posologie de 30 à 60 mg/kg selon l'âge des animaux. Les mécanismes par lesquels le lithium potentialise les effets de la pilocarpine ne sont pas complètement élucidés. Cette potentialisation pourrait se faire via une augmentation de l'expression et/ou de la sensibilité des récepteurs M1 (Marinho et al., 1998), par une

augmentation de la libération d'acétylcholine (Jope, 1979) ou par une modification de la voie des inositols phosphates (Casebolt and Jope, 1989;Whitworth et al., 1990). Le lithium ne potentialise que les effets de la pilocarpine. L'administration de lithium dans les modèles utilisant le kainate, le PTZ ou la bicuculline n'avait aucun effet (Ormandy et al., 1991).

2) Etat de mal épileptique lithium-pilocarpine et âge des animaux

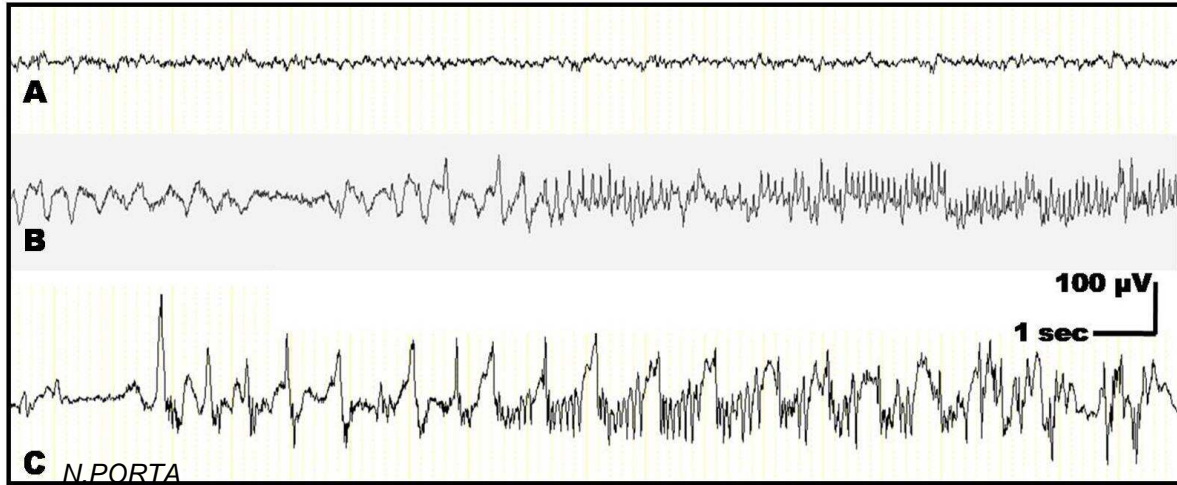
Le modèle lithium-pilocarpine se caractérise par trois phases : une phase aiguë lors de l'injection de la pilocarpine, puis une phase silencieuse qui est suivie d'une phase chronique. Dans cette étude nous nous intéresserons uniquement à la phase aiguë dont la sévérité des crises épileptiques dépend de l'âge des animaux et donc de la maturité cérébrale.

a) Rats adultes

Chez le rat adulte, tous les animaux développent un état de mal épileptique à la suite de l'administration de 30 mg/kg de pilocarpine. Cinq minutes après l'injection, les animaux présentent des signes d'origine cholinergique (diarrhées, pilo-érection, hyper salivation, ronflements respiratoires). Quinze à vingt minutes après l'injection, les animaux présentent des automatismes gustatifs, des mâchonnements, des grincements des dents, des hochements de la tête, des grattements avec les pattes arrière. Puis environ 25 minutes après l'injection de la pilocarpine, les crises motrices apparaissent avec des clonies de la tête, des clonies uni- ou bilatérales des pattes puis des redressements avec perte du contrôle postural (Cavalheiro et al., 2006). Ces crises épileptiques motrices surviennent de plus en plus régulièrement, puis s'installent de façon continue. L'état de mal épileptique peut durer 8 à 12 heures et des épisodes de crises récurrentes sont observés pendant 12 à 48 heures après l'induction. Afin de diminuer la mortalité, qui selon les études est de 22 % à 50 % pendant la phase aiguë, du diazépam ou du phénobarbital peut être administré quelques heures après le début de l'état de mal épileptique.

Les modifications des tracés EEG apparaissent progressivement suite à l'administration de la pilocarpine. Au niveau du cortex, l'activité rapide de bas voltage est remplacée progressivement par une activité rapide de haut voltage avec l'apparition de pointes ondes de plus en plus fréquentes et de plus en plus longues qui se propagent à tout le cortex (Figure 10).

Figure 10 : Illustration des modifications des tracés EEG à la suite de l'injection de pilocarpine. Enregistrement de l'activité corticale **A**- activité de base ; **B**- et **C**- décharges de pointes ondes.



b) Cerveau immature

Les effets de la pilocarpine chez les jeunes rats dépendent des posologies utilisées et de l'âge des animaux. Avant le 10^{ième} jour post-natal (P10) les animaux ne présentent ni d'état de mal épileptique ni de crises limbiques motrices. Avant P10 l'administration de pilocarpine chez les animaux induit une hypoactivité et des hochements de tête. Après P10, la sensibilité des animaux pour la pilocarpine augmente graduellement. A P11, l'administration de pilocarpine induit un état de mal épileptique. A partir de P14 les animaux présentent un état de mal épileptique et des conséquences à long terme avec l'apparition, après une phase silencieuse, de crises répétées spontanées qui peuvent aussi être réflexes. Ces effets sont confirmés à P21. A partir de P21, les animaux présentent des crises épileptiques comparables à celles des adultes avec toutefois des épisodes de redressements et de chutes moins nombreux et une apparition de l'état de mal épileptique en 40 minutes environ (Cavalheiro et al., 1987; Priel et al., 1996). Dans ces études, le taux de mortalité varie de 33 % à 62 % pendant la phase aiguë.

c) Conséquences à long terme chez les rats adultes

Chez le rat adulte, un état de mal épileptique lithium-pilocarpine d'une durée supérieure à une heure induit des modifications à long terme (Lemos and Cavalheiro, 1995). Ces modifications sont durables et elles conduisent à l'apparition de crises répétées

spontanées. Ces crises répétées spontanées surviennent en moyenne 14 jours après l'état de mal épileptique et la sévérité est graduelle. Les rats présentent deux à quatre crises épileptiques par semaine, et la fréquence augmente deux à trois mois après l'état de mal épileptique (Cavalheiro, 1995). Nous ne présenterons pas en détail ces modifications (perte cellulaire, bourgeonnement des fibres moussues, neurogenèse, dispersion des cellules granulaires, gliose réactionnelle) responsables de l'épileptogenèse car l'aspect neuropathologique ne sera pas abordé dans cette étude. De par ses caractéristiques le modèle lithium-pilocarpine a été utilisé dans les précédentes études pour appréhender les mécanismes d'épileptogenèse mais aussi pour tester le pouvoir antiépileptique de certaines molécules dans un modèle de crises épileptiques répétées spontanées.

II. Modèle de crises épileptiques induites par le PTZ

1) Le pentylènetétrazole (PTZ)

Le PTZ est un antagoniste non compétitif du GABA qui se fixe sur le récepteur canal GABA_A. Les dérivés tétrazoles se lient sur le site TBPS (t-butyl-bicyclo-phosphorotionate) du récepteur GABA_A. La fixation des dérivés tétrazoles sur ce site était corrélée aux convulsions observées chez des souris (Squires et al., 1984).

2) Modes d'administration

Dans le modèle au PTZ, les modes d'administrations varient selon les études. Le PTZ peut être administré en i.p., s.c., ou i.v. chez les rats et les souris.

a) Injections intrapéritonéales et sous-cutanées

Chez le rat les posologies utilisées en cas d'injection unique i.p. ou s.c. sont respectivement de 40 à 100 mg/kg et de 40 à 120 mg/kg. La majorité des études évaluant les propriétés anticonvulsivantes du régime cétogène se font avec des posologies comprises entre 50 et 85 mg/kg (Likhodii et al., 2000;Thavendiranathan et al., 2000;Thavendiranathan et al., 2003). Suite à l'injection, les animaux sont observés pendant 30 minutes et les

modifications comportementales et cliniques sont notées en fonction du temps. La sévérité des crises épileptiques peut également être évaluée selon une échelle de score.

b) Perfusion continue intraveineuse

Un autre modèle consiste à perfuser par voie veineuse et de façon continue une solution de PTZ (10 à 20 mg/mL). Dans ce modèle, les seuils d'apparition de la première clonie bilatérale des pattes avant et/ou de la crise d'épilepsie généralisée sont évalués en tenant compte de la durée de perfusion et du poids des animaux. Les taux de perfusion variaient selon les études, mais ils étaient de l'ordre de 1 mL/min chez les rats (Bough et al., 2000a; Bough and Eagles, 1999; Eagles et al., 2003; Nylén et al., 2005) et de 0,1 mL/min à 0,5 mL/min chez la souris (Mandhane et al., 2007; Samala et al., 2008; Sayyah et al., 2003). Pour un taux de perfusion de 1 mL/min l'apparition des crises épileptiques était observée en moins de 60 secondes pour un rat adulte (300 g) et en moins de 30 secondes pour un jeune rat (60 g). Avec une durée de perfusion très courte, il est peu probable que la diffusion du PTZ soit homogène dans les différents tissus dont le cerveau. De plus, une durée si courte ne permet pas de discriminer les modifications comportementales chez les animaux. Pour permettre une bonne distribution corporelle du PTZ il est ainsi préférable de choisir un taux de perfusion lent de l'ordre du mL/heure (Auvin et al., 2006). Cela permet de déterminer des seuils pour le premier sursaut myoclonique et pour la crise d'épilepsie généralisée qui sont plus espacés dans le temps et bien distingués l'un de l'autre.

3) Caractéristiques des crises épileptiques

a) Effet dose-dépendant

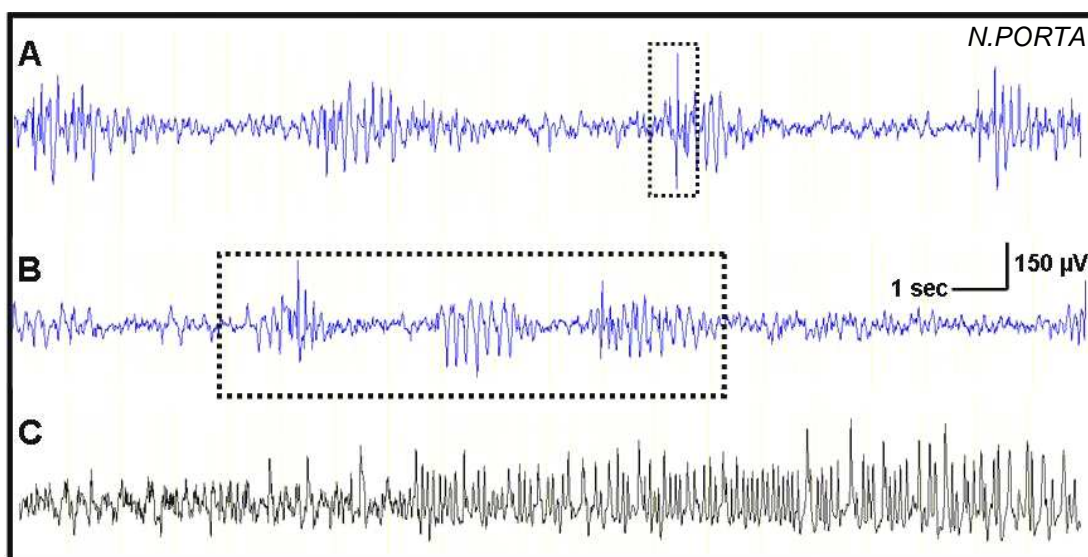
A faible dose (20-30 mg/kg), le PTZ induit des crises épileptiques de type absence. Au-delà de 30 mg/kg des manifestations myocloniques apparaissent, puis pour des posologies de 40 à 60 mg/kg des crises toniques et/ou tonico-cloniques surviennent. Les manifestations cliniques et électro-encéphalographiques induites par le PTZ apparaissent graduellement et sont doses dépendantes ce qui permet la détermination de seuils. Un état de mal épileptique peut être induit par des injections répétées de faibles doses de PTZ à intervalles réguliers (Cortez and Snead, III, 2006; Velisek, 2006).

b) Manifestations cliniques et électro-encéphalographiques

Les différentes manifestations cliniques apparaissent comme suit :

- arrêt du comportement (Figure 11 B)
- sursaut myoclonique (Figure 11 A)
- crise clonique
- crise généralisée tonico-clonique avec redressement sur les pattes arrière et chute posturale (Figure 11 C)

Figure 11 : Illustration des modifications des tracés EEG suite à l'administration de pentylènetétrazole. Enregistrement de l'activité corticale : **A**- Myoclonie ; **B**- Absences ; **C**- Crise tonique.



c) Effet de l'âge des animaux et effets à long terme

Les crises épileptiques induites par le PTZ sont reproductibles chez les rongeurs, et les modifications cliniques sont facilement observées. Le seul bémol concerne la première quinzaine de vie des animaux, période pendant laquelle les arrêts du comportement et les crises cloniques sont peu nombreux et difficilement visualisables sans enregistrement EEG associé (Velisek, 2006).

Le modèle de crises épileptiques induites par le PTZ n'induit pas de lésions neuronales ni de crises épileptiques répétées spontanées à long terme. Ce modèle n'est pas responsable d'un phénomène d'épileptogenèse (Velisek, 2006). Le modèle au PTZ est un modèle

d'évaluation des propriétés anticonvulsivantes, et il est largement utilisé pour évaluer les propriétés anticonvulsivantes des nouvelles molécules antiépileptiques (Holmes, 2007; Meldrum, 2002).

III. Choix des modèles

Dans ce travail, nous avons choisi d'évaluer les propriétés anticonvulsivantes du régime cétogène, des AGPI et de l'activation des récepteurs PPAR-alpha dans deux modèles de crises épileptiques. Nous avons choisi d'évaluer les conséquences de tels traitements dans un modèle d'état de mal épileptique lithium-pilocarpine et dans un modèle de crises épileptiques induites par le PTZ. Le choix de ces deux modèles repose en partie, sur le fait que les mécanismes conduisant à l'apparition des crises épileptiques sont différents. Dans le modèle lithium-pilocarpine, les crises épileptiques apparaissent suite à une augmentation de la neurotransmission excitatrice, tandis que dans le modèle au PTZ les crises surviennent suite à une inhibition de la neurotransmission inhibitrice. Ces deux modèles permettent donc une évaluation complémentaire en sachant qu'il a été précédemment évoqué que le régime cétogène avait des propriétés anticonvulsivantes uniquement dans les modèles où les crises épileptiques étaient induites par une modulation des voies GABAergiques (Bough et al., 2002).

L'induction d'un état de mal épileptique par le modèle lithium-pilocarpine a été préférée au modèle faisant appel au kaïnate car une étude précédente rapportait l'absence de propriétés anticonvulsivantes du régime cétogène dans un modèle d'état de mal épileptique induit par du kaïnate (Bough et al., 2002). Dans cette étude, l'analyse était basée sur la latence d'apparition des crises épileptiques et sur leur sévérité mais sans enregistrement EEG associé. Afin de préciser notre analyse nous avons choisi d'évaluer le délai d'apparition des crises épileptiques avec un enregistrement EEG associé. A l'opposé, nous avons choisi le modèle de seuils au PTZ par perfusion i.v. continue. D'une part, l'efficacité anticonvulsivante du régime cétogène dans le cadre de ce modèle est bien décrite chez le rat. D'autre part, ce modèle permet une induction progressive de la crise épileptique généralisée, avec des modifications comportementales caractéristiques et reproductibles d'un animal à l'autre. Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi de travailler avec les seuils pour l'apparition de la première clonie bilatérale des pattes avant et pour la survenue de la crise épileptique généralisée.

Chapitre IV : résultats

RESULTATS : Expérimentaux et cliniques

Résultats expérimentaux

Partie I :

Evaluation des propriétés anticonvulsivantes des acides gras poly-insaturés

L'objectif de ce travail était d'évaluer si l'apport entérale pendant 30 jours par deux mélanges de ratios acide linoléique / acide alpha linoléique différents conduisait à une augmentation des seuils myocloniques au PTZ. Ces résultats étaient comparés à ceux obtenus après un traitement de 30 jours par le régime cétogène. Un des mélanges contenait 70 % d'acide alpha linoléique et 25 % d'acide linoléique et l'autre contenait 11,2 % d'acide linoléique et 1,7% d'acide alpha linoléique.

Méthodes utilisées : analyse de la composition corporelle en matière grasse, seuils au PTZ (i.v.), dosages des AGPI contenus dans les phospholipides plasmatiques et cérébraux.

I. Méthodologies

1) Animaux

Les travaux ont été réalisés chez des rats Wistar (Charles River, France) âgés de 4 semaines, et hébergés selon un cycle jour/nuit de 12 heures avec le début du cycle lumineux à 7h00. L'accès à la nourriture était libre avant la mise en place des traitements, et l'accès à l'eau était libre tout au long de l'étude.

2) Traitement

Les animaux étaient pesés et partagés en quatre groupes qui recevaient les régimes alimentaires suivant : (1) de la poudre alimentaire standard (groupe contrôle n=23 ; Harlan Teklad Global 2016) ; (2) un régime cétogène isocalorique de ratio 4/1 (groupe KD n=22 ; Ketocal SHS) ; (3) de la poudre alimentaire standard et un apport entérale quotidien avec un mélange ALA/LA composé d'acides : linoléique (LA), alpha linoléique (ALA) et oléique (groupe LINO n=19 ; Sigma-Aldrich) ; (4) de la poudre alimentaire standard et un apport entérale quotidien d'un mélange dit LCP composé d'acides : linoléique (LA), alpha linoléique (ALA), arachidonique (AA), eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque [DHA] (groupe LCP n= 23 ; LCP SHS). Les animaux recevaient les différents régimes alimentaires sur une période de 30 jours. Le détail des différents régimes est reporté dans le tableau 7.

Les animaux nourris par le régime alimentaire standard (groupes contrôle, LINO et LCP) recevaient la nourriture à volonté, tandis que le régime cétogène était administré sur la base des besoins caloriques des rats de laboratoires soit 0,3 kcal/g/jour (Rogers, 1979). Les mélanges ALA/LA et LCP étaient administrés à l'aide d'une sonde de gavage gastrique aux posologies de 6 g/kg/jour pour le mélange ALA/LA et de 5 g/kg/jour pour le mélange LCP. A la posologie de 6 g/kg/jour, le mélange ALA/LA apportait autant d'ALA+LA que le régime cétogène (pour le régime cétogène ALA + LA= 5,27 g/kg/jour, pour le mélange ALA/LA ALA + LA= 5,24 g/kg/jour). Tandis que le mélange LCP apportait 1,5 g/kg/jour d'ALA + LA. Tous les animaux étaient pesés au moins deux fois par semaine.

Tableau 7 : Composition des différents régimes en AGPI (acide linoléique [LA] et acide alpha linoléique [ALA], acide arachidonique [AA], acide eicosapentaénoïque (EPA) et acide docosahexaénoïque [DHA]).

	Régime standard	Régime cétogène	Mélange ALA/LA	Mélange LCP
AGPI totaux	2,46 %	17,5 %	95 %	41,9 %
LA (n-6)	2,31 %	16 %	25 %	11,2 %
ALA (n-3)	0,15 %	1,5 %	70 %	1,7 %
AA (n-6)				7,4 %
EPA (n-3)				5,5 %
DHA (n-3)				8 %
Autres n-6				4,7 %
Autres n-3				3,4 %

3) Seuil au PTZ

Un seuil au PTZ (Sigma-Aldrich) était réalisé 30 jours après le début de chaque traitement. Les seuils étaient réalisés entre 9h00 et 12h00. Une solution de PTZ à 10 mg/mL était réalisée dans une solution de sérum salé. La solution était perfusée à 2 mL/h par une voie veineuse insérée dans une des veines caudales (Figure 12). Le temps de perfusion était noté lors du premier sursaut myoclonique des pattes avant et la perfusion était stoppée (groupes : contrôle n=14; KD n=9; LINO n=6, LCP n=11). A partir du temps de perfusion et de la quantité de PTZ perfusée, un seuil myoclonique au PTZ pouvait être calculé. Ce seuil est exprimé en mg/kg (Auvin et al., 2006; Loscher et al., 1991; Pollack and Shen, 1985).

Figure 12 : Illustration de la réalisation d'un seuil au PTZ chez un rat Wistar. Perfusion continue via une voie veineuse caudale.

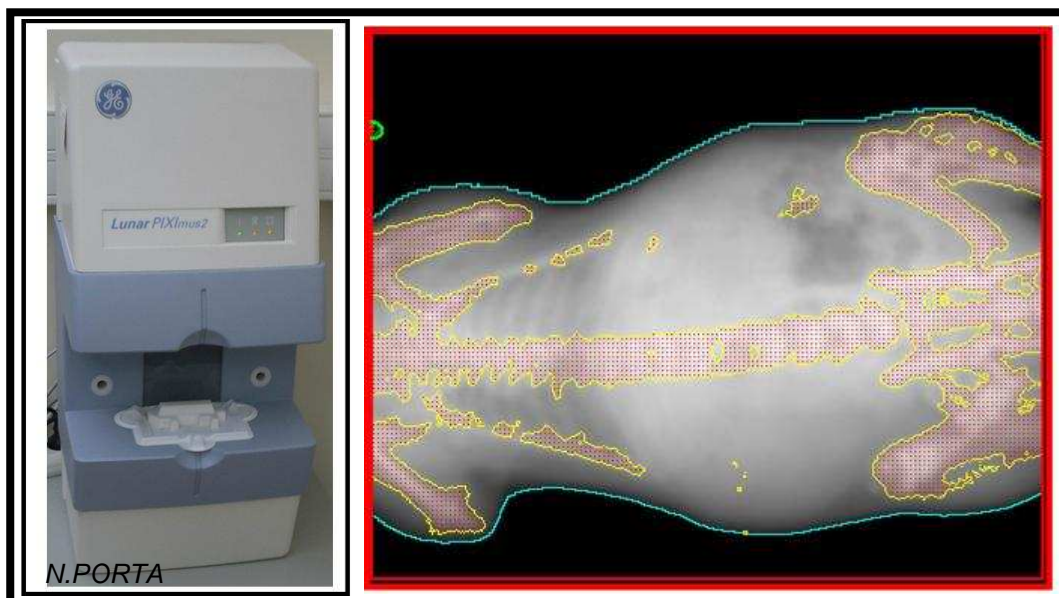


4) Composition corporelle

La composition corporelle est mesurée par absorptiométrie biphotonique en utilisant le densitomètre Lunar PIXImus (GE Lunar Corp., Madison, WI, USA) conçu pour l'étude de la composition corporelle chez les rongeurs. Cette technique est non invasive. Elle utilise deux faisceaux de rayons X possédant deux énergies différentes et permet de déterminer trois paramètres : la masse maigre, la masse grasse et la masse osseuse (Figure 13). Mesures réalisées au laboratoire de Biophysique de Lille, avec l'aide de Madame Maud Pierre.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à étudier l'évolution de la masse grasse des animaux six jours avant la mise en place des régimes alimentaires (J0) et le dernier jour des régimes alimentaires (J30). Pour réaliser cette étude, les rats étaient anesthésiés par une injection i.p. d'hydrate de chloral (300 mg/kg). Après l'anesthésie, les rats étaient pesés, placés face ventrale vers le bas sur le plateau de l'appareil, puis soumis à l'analyse. La mesure des différents paramètres est rapide [environ 5 minutes] (Nagy and Clair, 2000). Une fois l'analyse terminée, les rats étaient replacés dans leur cage et surveillés jusqu'à leur réveil (groupes : contrôle n=12; KD n=9; LINO n=7, LCP n=12).

Figure 13 : A gauche le PIXImus et à droite une illustration de l'analyse de la composition corporelle d'un rat.



5) Composition en acides gras du sang et du cerveau

En collaboration avec le Docteur Claude Galabert (Hôpital R. Sabran, HYERES, France), la composition en acides gras des fractions PC (phosphatidylcholine) des phospholipides sériques, et PC et PE (phosphatidyléthanolamine) des phospholipides cérébraux de rats nourris pendant quatre semaines par les quatre régimes différents était étudiée. Les échantillons sanguins et de cerveau étaient récoltés lors du sacrifice des animaux par l'injection i.p. d'une dose létale de pentobarbital (180 mg/kg). Le sang était prélevé par une ponction intracardiaque et centrifugé 20 minutes à 4°C et 3500 tours par minute, puis le plasma était récupéré et placé à -80°C. Suite au prélèvement sanguin, les cerveaux étaient récupérés, congelés dans de l'azote liquide et stockés à -80°C.

L'extraction des lipides contenus dans le plasma et les homogénats de cerveaux était réalisée avec un mélange chloroforme / méthanol en accord avec la méthode de Bligh et Dyer (BLIGH and DYER, 1959). Les mesures étaient effectuées à partir de 200 µL de plasma et 300 à 600 mg de tissus cérébraux. La phase organique obtenue après l'extraction était concentrée et les différents lipides étaient séparés par une HPTLC (high performance thin layer chromatography) unidimensionnelle (plasma) ou bidimensionnelle [cerveau] (Galabert et al., 1987). Les phospholipides isolés des sous-classes PC et PE étaient récoltés de la plaque de HPTLC et trans-estérifiés dans 14 % de boron tri-fluoride méthanol (Alletech) dans des tubes scellés sous une atmosphère d'azote à 100°C pendant 45 minutes (MORRISON and SMITH, 1964). Les acides gras méthyl-esters obtenus étaient extraits avec du pentane, desséchés par du sodium sulfate déca-hydraté ($\text{Na}_2\text{SO}_4, 10\text{H}_2\text{O}$), évaporés dans un concentrateur sous vide et préparés pour la chromatographie phase gazeuse. Les acides gras méthyl-esters étaient séparés et quantifiés par chromatographie phase gazeuse.

Les données de l'analyse lipidique étaient calculées sous la forme de pourcentage de chaque acide gras comparé à la somme des concentrations de tous les acides gras à l'intérieur d'une classe de phospholipides (groupes : pour les PC sériques contrôle n=9, KD n=9, LINO n=13, LCP n=11) ; pour les PC cérébraux contrôle n=6, KD n=13, LINO n=10, LCP n=10 ; pour les PE cérébraux contrôle n=6, KD n=10, LINO n=13, LCP n=10).

Les AGPI analysés étaient l'acide gamma linoléique (GLA, C18 :3 n-6), l'acide alpha linoléique (ALA, C18 :3 n-3), l'acide arachidonique (AA, C20 :4 n-6), l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20 :5 n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA C22 :6 n-3). L'acide gamma linoléique est le premier AGPI synthétisé à partir du LA.

6) Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyennes +/- l'écart standard à la moyenne. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel SPSS version 15 (LEAD Technologies, Chicago, IL). Les tests utilisés étaient des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis afin de comparer tous les groupes entre eux. Quand les résultats des tests de Kruskal-Wallis étaient significatifs ($p < 0,05$) un test de Mann et Whitney était réalisé afin de comparer les groupes deux à deux. La corrélation était analysée selon un test de Pearson.

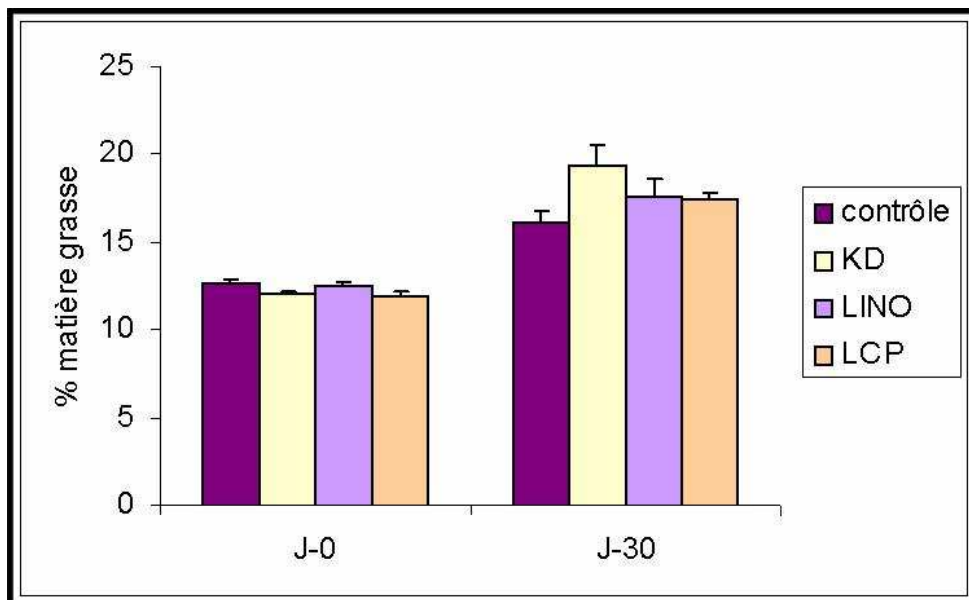
II. Résultats

La composition corporelle en masse grasse des animaux était comparable entre les groupes. Elle augmentait entre le premier et le dernier jour des régimes alimentaires.

Les animaux étaient bien nourris tout au long de l'étude, et la bonne prise alimentaire était accompagnée d'une prise de poids chez tous les animaux entre le premier et le dernier jour de traitement.

Lors de la mise en place des différents régimes alimentaires, les animaux avaient un pourcentage de masse grasse corporelle comparable. Après les 30 jours de traitement, le pourcentage de masse grasse corporelle augmentait, mais restait comparable quel que soit le régime alimentaire reçu par les animaux (Figure 14).

Figure 14 : Pourcentages de masse grasse corporelle six jours avant la mise en place des différents régimes (J0) et le dernier jour du régime (J30). Les mesures étaient réalisées avec un PIXImus chez 12 animaux contrôles, 9 animaux du groupe KD, 7 animaux du groupe LINO et 12 animaux du groupe LCP.

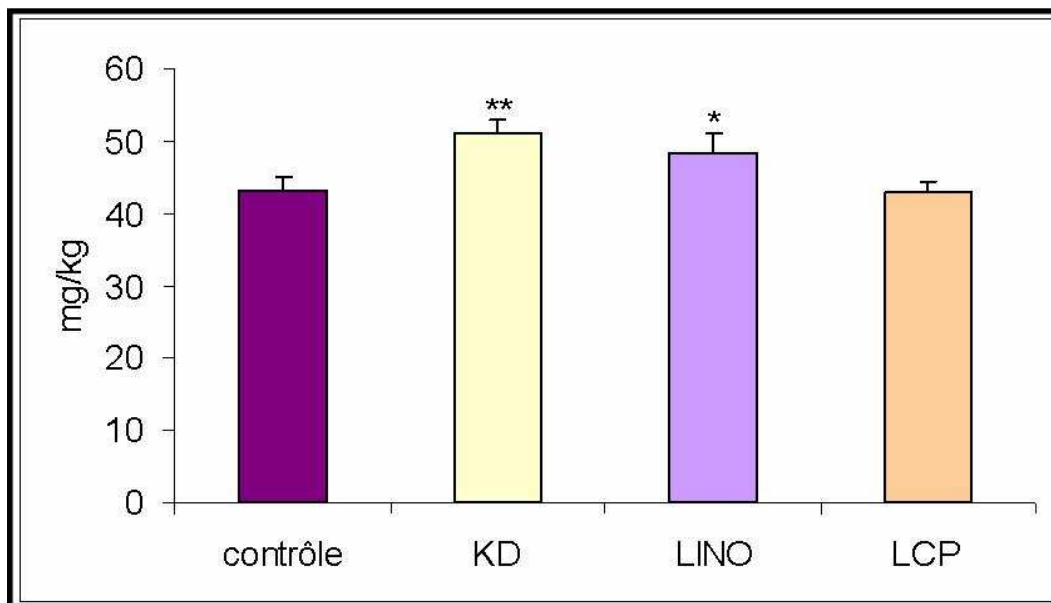


Les seuils au PTZ étaient augmentés chez les animaux ayant reçu le régime cétogène ou un le mélange ALA/LA.

Les animaux ayant reçu pendant 30 jours le régime cétogène ou le mélange ALA/LA présentaient une augmentation ($p < 0,05$) du seuil au PTZ pour l'apparition du premier sursaut myoclonique des pattes avant (Figure 15).

Les animaux ayant reçu le mélange LCP présentaient des seuils au PTZ comparables à ceux des animaux du groupe contrôle. Les seuils au PTZ des animaux du groupe LCP étaient significativement inférieurs à ceux des groupes KD et LINO.

Figure 15 : Seuils myocloniques au PTZ chez les animaux traités 30 jours par de la poudre alimentaire standard (n=14), un régime cétogène (n=9), par le mélange ALA/LA (n=6) ou en LCP (n=11). Les résultats sont des moyennes +/- esm, exprimés en mg/kg. Les différences intergroupes sont notées avec * $p < 0,05$ ou ** $p < 0,005$ versus les groupes contrôle et LCP.



La composition en acides gras plasmatiques était modifiée par les différents régimes alimentaires.

Les animaux ayant été traités par le régime cétogène ou par le mélange ALA/LA présentait une diminution de l'AA contenu dans les PC sériques en comparaison aux animaux du groupe contrôle et du groupe LCP (Figure 16).

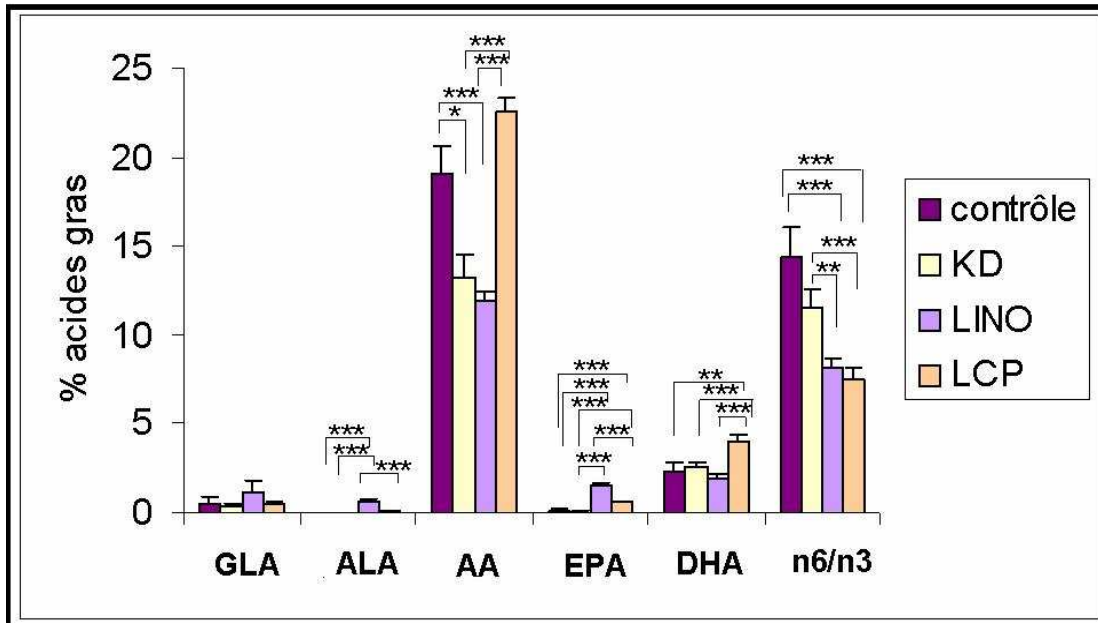
Les pourcentages d'EPA et d'ALA contenus dans les PC sériques étaient augmentés pour les animaux complétés par les mélanges ALA/LA (groupe LINO) et LCP (groupe LCP) en comparaison avec les groupes contrôle et KD. L'augmentation de l'ALA et de l'EPA contenus dans les PC sériques pour le groupe LINO était significativement plus importante que chez le groupe LCP.

Les animaux du groupe LCP présentait une augmentation du DHA contenu dans les PC sériques en comparaison avec les groupes contrôle, KD et LINO.

Le ratio n-6/n-3 était diminué pour les groupes LCP et LINO en comparaison avec le groupe contrôle et le groupe KD.

Aucune modification n'était observée pour le pourcentage sérique de GLA quels que soient les régimes alimentaires suivis par les animaux.

Figure 16: Composition plasmatique en acides gras poly-insaturés dans la fraction phosphatidylcholine (PC) des groupes contrôle (n=9), KD (n=9), LINO (n=13) ou LCP (n=11). Les résultats sont des moyennes +/- esm, exprimés en % des acides gras totaux dans les phospholipides. Les différences intergroupes sont notées * p < 0,02, ** p < 0,01 ou *** p < 0,005. [GLA : acide gamma linoléinique ; ALA : acide alpha linoléinique ; AA : acide arachidonique ; EPA : acide eicosapentaénoïque ; DHA : acide docosahexaénoïque ; n-6/n-3 : ratio oméga-6/oméga-3].



La composition en acides gras cérébraux n'était pas modifiée par les différents régimes alimentaires.

Aucune différence concernant les fractions PC et PE cérébrales n'était observée entre les animaux ayant reçu de la nourriture standard, le régime cétogène, le mélange ALA/LA ou le mélange LCP. Les différents AGPI : GLA, ALA, AA, EPA, DHA étaient comparables quel que soit le traitement (Figures 17 et 18).

En revanche, pour les fractions PC et PE le ratio n-6/n-3 était significativement diminué chez les animaux du groupe LCP. Ces animaux présentaient une augmentation de la quantité d'AGPI n-3 dans les fractions PC et PE cérébrales.

Figure 17 : Composition cérébrale en acides gras poly-insaturés dans la fraction phosphatidylcholine (PC) des groupes contrôle (n=6), KD (n=13), LINO (n=10) ou LCP (n=10). Les résultats sont des moyennes +/- esm, exprimés en % des acides gras totaux dans les phospholipides. Les différences intergroupes sont notées * p < 0,02, ** p < 0,005. [GLA : acide gamma linoléinique ; ALA : acide alpha linoléinique ; AA : acide arachidonique ; EPA : acide eicosapentaénoïque ; DHA : acide docosahexaénoïque ; n-6/n-3 : ratio oméga-6/oméga3].

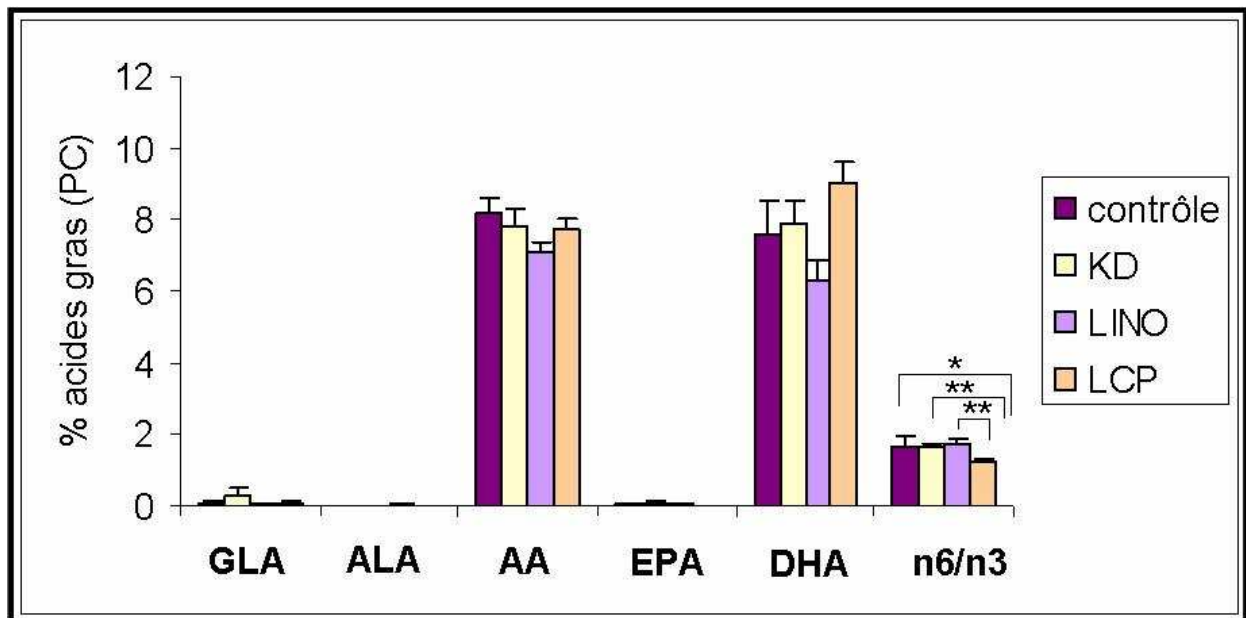
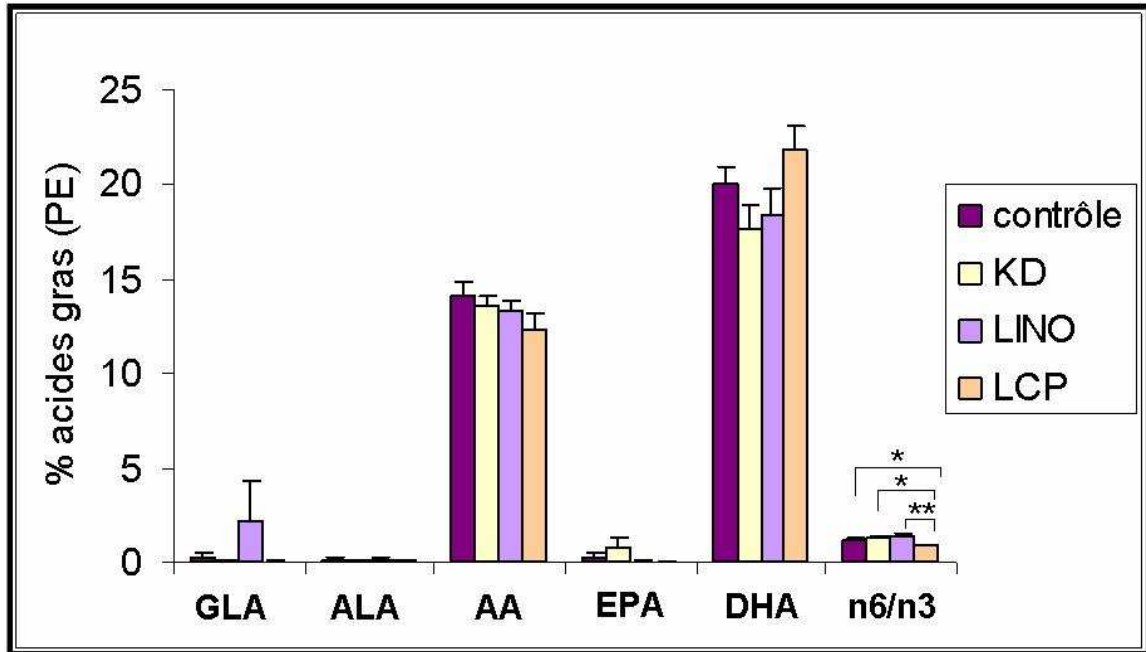


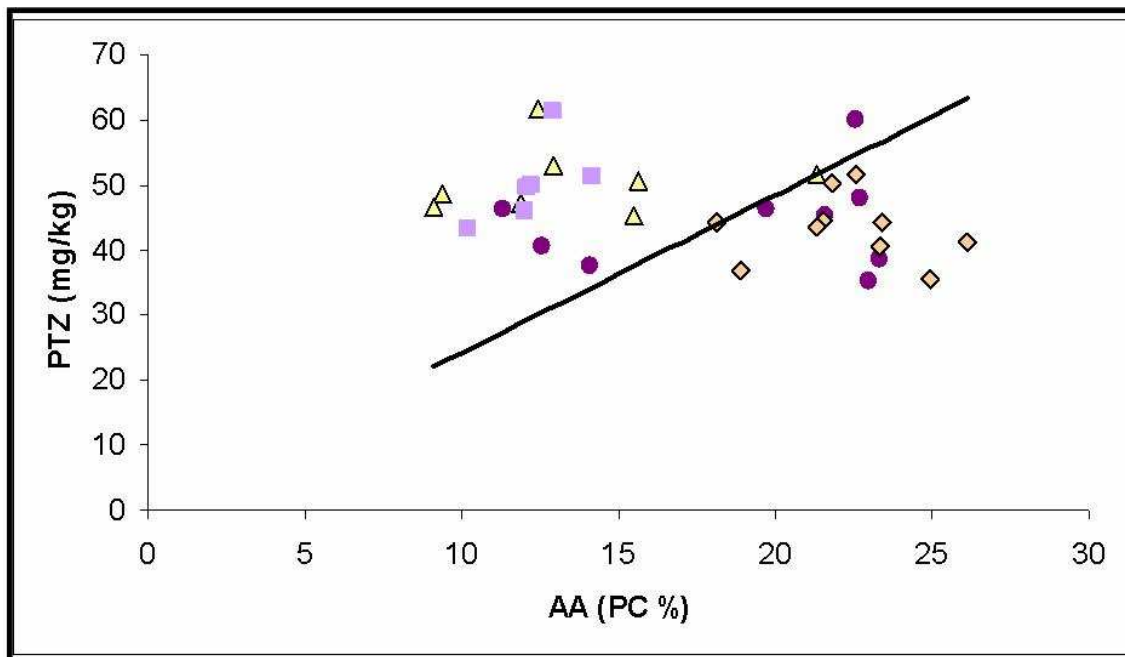
Figure 18: Composition cérébrale en acides gras poly-insaturés dans la fraction phosphatidyléthanolamine des groupes contrôle (n=6), KD (n=10), LINO (n=13) ou LCP (n=10). Les résultats sont des moyennes +/- esm, exprimés en % des acides gras totaux dans les phospholipides. Les différences intergroupes sont notées * p < 0,01, ** p < 0,005. [GLA : acide gamma linoléinique ; ALA : acide alpha linoléinique ; AA : acide arachidonique ; EPA : acide eicosapentaénoïque ; DHA : acide docosahexaénoïque ; n-6/n-3 : ratio oméga-6/oméga3].



La corrélation entre la diminution des seuils au PTZ et la diminution de l'AA contenu dans les phospholipides plasmatiques était négative.

L'augmentation des seuils au PTZ chez les animaux traités par le régime cétogène ou recevant le mélange ALA/LA était négativement corrélée à la diminution de l'AA contenu dans les phospholipides plasmatiques. Les résultats sont présentés figure 19 avec $r = 0,09$ et $p = 0,085$.

Figure 19 : Corrélation entre les seuils au PTZ et la variation de l'AA contenu dans les phospholipides membranaires après 30 jours de traitement par le régime cétogène, après 30 jours de traitement par les mélanges ALA/LA ou LCP et après 30 jours d'alimentation normale. Le coefficient de détermination $r = 0,09$ et $p = 0,085$ pour une corrélation négative. Groupe contrôle : ronds violets (n=9) ; groupe KD : triangles jaunes (n=8) ; groupe Lino : carrés mauves (n=6) ; groupe LCP : carrés roses (n=10).



III. Conclusion

Nos résultats suggèrent que l'apport entérale pendant 30 jours par un mélange composé de 70 % d'AGPI n-3 (ALA) et de 25 % d'AGPI n-6 (LA) a des propriétés anticonvulsivantes comparables à celles observées suite à un traitement par le régime cétoène. En revanche, le mélange LCP contenant 20 % d'AGPI n-6 (LA > AA) et 16 % d'AGPI n-3 (DHA > EPA > ALA) n'avait pas de propriétés anticonvulsivantes. Ces résultats suggèrent que la qualité des AGPI apportés aurait un rôle dans l'apparition des propriétés anticonvulsivantes. Des études récentes montraient que chez des souris, l'apport entérale exclusif d'EPA ou de DHA (6 g/kg/jour) n'avait pas d'effet anticonvulsivant dans plusieurs modèles [fluorothyl, PTZ i.v., modèle 6 hertz et état de mal épileptique induit par le kaïnate (35 mg/kg, i.p.)] (Willis et al., 2008), tandis que l'administration de 200 mg/kg (i.p.) du mélange SR-3 (LA/ALA 4/1) chez des rats avait des propriétés anticonvulsivantes (doses dépendantes) dans une évaluation par le PTZ [80 mg/kg, i.p.] (Taha et al., 2008a).

Le régime cétoène ainsi que l'apport d'AGPI par les mélanges ALA/LA et LCP ne modifiaient pas le statut nutritionnel des animaux. Les propriétés anticonvulsivantes du régime cétoène et du mélange ALA/LA s'accompagnaient d'une modification des d'AGPI contenus dans les phospholipides plasmatiques (diminution de l'AA pour les deux groupes et d'une augmentation de l'ALA et de l'EPA uniquement pour le groupe LINO). L'apport quotidien du mélange LCP induisait également des modifications des AGPI plasmatiques (EPA, DHA). Mais parmi toutes les modifications observées, une seule semble liée aux propriétés anticonvulsivantes observées chez les animaux des groupes LINO et KD. Il s'agit de la diminution de l'AA contenu dans les phospholipides plasmatiques pour les groupes LINO et KD en comparaison aux groupes contrôle et LCP. Le lien entre propriétés anticonvulsivantes et diminution de l'AA plasmatique nécessite d'être clarifié, mais la corrélation linéaire que nous avons réalisée ne donne pas une modélisation valide de ce lien.

Deux études cliniques rapportaient des résultats contradictoires à ce sujet (Dahlin et al., 2007; Fraser et al., 2003). Dans une étude, il était retrouvé chez 9 patients, une corrélation entre l'augmentation de l'AA contenu dans les acides gras estérifiés plasmatiques et l'efficacité du régime cétoène (Fraser et al., 2003). Dans l'autre étude, une diminution de l'AA contenu dans les phospholipides plasmatiques était retrouvée chez 26 patients traités par le régime cétoène. Mais cette diminution n'était pas corrélée à l'efficacité de celui-ci, de plus la version du régime cétoène utilisée était enrichie en AGPI n-3 (Dahlin et al., 2007).

Dans notre étude il n'y avait pas de modification des AGPI contenus dans les phospholipides cérébraux (fractions PC et PE) chez les animaux quel que soit le traitement. Seul le ratio n-6/n-3 était significativement diminué pour le groupe LCP. Mais cela semble refléter les apports alimentaires complexes liés à la composition du mélange LCP. Notre étude montrait ainsi l'absence de lien entre propriétés anticonvulsivantes et modification des AGPI contenus dans les phospholipides cérébraux. Une étude récente rapportait également l'absence de modification des AGPI contenus dans les acides gras totaux estérifiés cérébraux chez des rats traités 21 jours par le mélange SR-3 (LA/ALA 4/1) (Taha et al., 2008a). Mais dans cette étude, il était rapporté une modification de la teneur cérébrale en AGPI n-3 contenus dans les acides gras totaux libres.

Nous avons donc vu qu'un apport entérale en ALA/LA avait des propriétés anticonvulsivantes comparables à celles observées suite à un traitement par le régime cétogène. Les propriétés anticonvulsivantes semblaient liées à une diminution de l'AA contenu dans les phospholipides plasmatiques mais aucune modification des AGPI contenus dans les phospholipides cérébraux n'était retrouvée. Une évaluation du contenu cérébral en AGPI non estérifiés mériterait d'être réalisée dans notre modèle. Les variations plasmatiques en AGPI nécessitent d'être davantage explorées et clarifiées. De même que les aspects qualitatifs et quantitatifs des apports en AGPI.

Publication 1 :

**Anticonvulsant effects of linolenic acid are unrelated to brain
phospholipid cell membrane compositions**

Natacha Porta, Béatrice Bourgois, Claude Galabert, Cécile Lecointe,
Pierre Cappy, Régis Bordet, Louis Vallée, and Stéphane Auvin

Epilepsia 2008, *in press*

Résultats expérimentaux

Partie II :

Activation des récepteurs nucléaires PPAR-alpha et propriétés anticonvulsivantes

L'objectif de ce travail était d'évaluer si l'activation des récepteurs nucléaires PPAR-alpha par un agoniste synthétique (le fénofibrate) conduisait à augmenter les seuils au PTZ, et à retarder l'apparition d'un état de mal épileptique lithium-pilocarpine.

Méthodes utilisées : seuils au PTZ, état de mal épileptique lithium-pilocarpine, enregistrements de type électro-encéphalogrammes.

I. Méthodologies

1) Animaux

Les travaux ont été réalisés chez des rats Wistar (Janvier, France) pesant 280-320 g, et hébergés selon un cycle jour/nuit de 12 heures avec le début du cycle lumineux à 7h00. L'accès à la nourriture était libre avant la mise en place des traitements, et l'accès à l'eau était libre tout au long de l'étude.

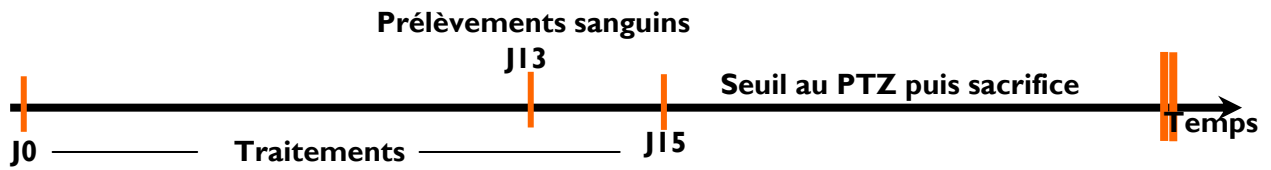
2) Traitements

Les animaux étaient pesés et partagés en quatre groupes qui recevaient les régimes alimentaires suivant : (1) de la poudre alimentaire standard (groupe contrôle n=16 ; Harlan Teklad Global 2016) ; (2) un régime cétogène isocalorique de ratio 4/1 (groupe KD n=16 ; Ketocal SHS) ; (3) de la poudre alimentaire standard contenant 0,2 % de fenofibrate (groupe F n=16 ; Sigma-Aldrich) ; (4) un régime cétogène isocalorique contenant 0,2 % de fénofibrate (groupe KDF n=10). Les animaux recevaient les différents régimes alimentaires sur une période de 14 jours. Les animaux nourris par le régime alimentaire standard (groupes contrôle et F) recevaient la nourriture à volonté tandis que le régime cétogène (groupes KD et KDF) était administré sur la base des besoins caloriques des rats de laboratoires soit 0,3 kcal/g/jour (Rogers, 1979). Les animaux étaient pesés deux fois par semaine.

3) Seuils au PTZ

Un seuil au PTZ (Sigma-Aldrich) était réalisé 14 jours après le début de chaque traitement. Les seuils étaient réalisés entre 9h00 et 12h00. Une solution de PTZ à 10 mg/mL était préparée dans une solution de sérum salé. La solution était perfusée à 5 mL/h par une voie veineuse insérée dans une des veines caudales. Les temps de perfusion étaient notés lors du premier sursaut myoclonique des pattes avant et lors du début de la crise d'épilepsie généralisée. La perfusion était stoppée au début de la crise d'épilepsie généralisée (groupes : contrôle n=8; KD n=7; F n=7 ; KDF n=10). A partir des temps de perfusion et de la quantité de PTZ perfusée, un seuil myoclonique au PTZ et un seuil de crise au PTZ pouvaient

être calculés. Ces seuils sont exprimés en mg/kg (Auvin et al., 2006; Loscher et al., 1991; Pollack and Shen, 1985).



4) Chirurgie, EEG et état de mal épileptique

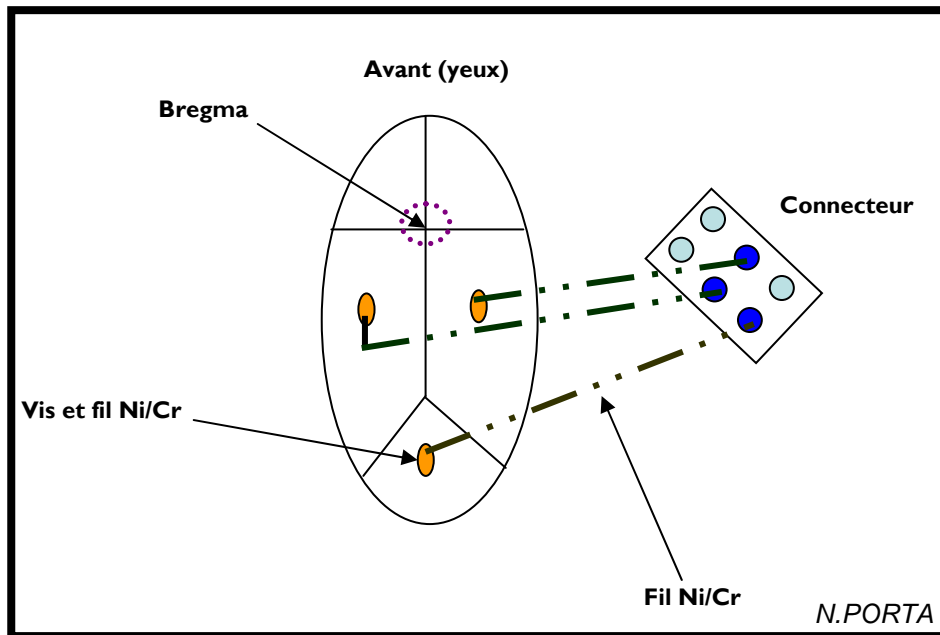
Chirurgie

Quatorze jours après la mise en place des différents régimes alimentaires, les rats étaient anesthésiés par une injection i.p. d'hydrate de chloral (300 mg/kg, Sigma-Aldrich) et placés dans un appareil de stéréotaxie. Les électrodes (vis et fil Ni/Cr) étaient implantées pour pouvoir effectuer un enregistrement cortical bipolaire (AP : -12mm; ML : 0mm; V : 0mm) et (AP : 4.5mm; ML : 4 or -4mm; V : 0mm). Le montage était maintenu en place par du ciment dentaire. La figure 20 représente le dispositif d'implantation et la figure 21 schématise la localisation des électrodes.

Figure 20 : Illustration de l'implantation des électrodes chez un rat Wistar.

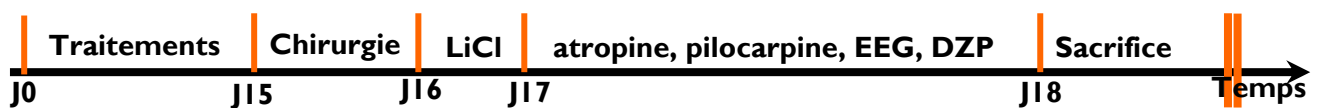


Figure 21 : Schéma présentant le montage effectué lors de la procédure chirurgicale.



Etat de mal épileptique

Vingt-quatre heures après la procédure chirurgicale, les animaux recevaient une injection s.c. de chlorure de lithium (3 mEq/kg ; Sigma-Aldrich). Puis 18 à 20 heures après cette première injection, les animaux recevaient une injection s.c. de pilocarpine (30 mg/kg ; Sigma-Aldrich). De l'atropine était administrée par voie i.p. (5 mg/kg ; Sigma-Aldrich) 30 minutes avant la pilocarpine afin de limiter les effets secondaires périphériques liés à la pilocarpine.



Enregistrement EEG

Juste après l'injection d'atropine, un câble venant de l'ordinateur était relié au connecteur et les animaux étaient placés 10 minutes dans les cages en plastique transparent (30 * 40 cm) pour habitude. L'activité électrique corticale pouvait alors être enregistrée à l'aide du logiciel Coherence (Deltamed, France). Une fois les rats habitués à leur nouvel environnement, l'activité de base était enregistrée pendant 5 minutes puis la pilocarpine était injectée. Deux heures après le début de l'état de mal épileptique, les animaux recevaient une

injection i.p. de diazépam (1,25 ou 2,5 mg/kg) de façon à stopper l'état de mal épileptique et à limiter la mortalité des animaux. Les latences (secondes) entre l'injection de la pilocarpine et l'apparition des premières décharges de type pointes ondes, de durées supérieures ou égales à 1 et à 5 minutes étaient alors notées (groupes : contrôle n=8, KD n=9 et F n=9).

5) Analyses des paramètres métaboliques

L'administration de fénofibrate chez les rongeurs conduit à une prolifération des cellules et des peroxysomes hépatiques (Lalwani et al., 1983; Sim et al., 1981; Tanaka et al., 1992; Yang et al., 2008). Pour nous assurer de l'efficacité pharmacologique du traitement par le fénofibrate, le poids des foies des animaux était relevé lors du sacrifice. A la suite des seuils au PTZ, ou 24 heures après l'état de mal épileptique, les animaux étaient sacrifiés par une injection létale i.p. de pentobarbital (180 mg/kg) [groupes : contrôle n=8, KD n=7, F n=8, KDF n=10].

Un des marqueurs de l'efficacité du régime cétogène est la production de corps cétoniques dont la concentration plasmatique augmente. Pour nous assurer de l'efficacité du traitement par le régime cétogène, nous avons dosé après 13 jours de traitement, le bêta hydroxybutyrate (BHB) plasmatique en utilisant le kit Ranbut D-3-Hydroxybutyrate (Radox). Ces analyses étaient effectuées sur des échantillons de sang prélevés dans une des veines caudales (groupes : contrôle n=11; KD n=8 ; F n=11; KDF n=11). Les résultats sont exprimés en mmol/L. Ces dosages ont été réalisés avec l'aide d'Emmanuel Bouchaert (Inserm U545, Institut Pasteur de Lille).

6) Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyennes +/- l'écart standard à la moyenne. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel SPSS version 15 (LEAD Technologies, Chicago, IL). Les tests utilisés étaient des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis afin de comparer tous les groupes entre eux. Quand les résultats des tests de Kruskal-Wallis étaient significatifs ($p < 0,05$) un test de Mann et Whitney était réalisé afin de comparer les groupes deux à deux.

II. Résultats

Les traitements utilisés étaient pharmacologiquement actifs.

Les rats traités par le fénofibrate (groupes F et KDF) présentaient une augmentation ($p < 0,001$) du poids du foie (ratio poids du foie / poids du corps) par rapport aux animaux des groupes contrôle et KD (Tableau 8).

Les animaux traités par le régime cétogène (groupes KD et KDF) présentaient une augmentation ($p < 0,001$) du BHB plasmatique par rapport aux animaux du groupe contrôle. Seuls les animaux du groupe KD présentaient une augmentation ($p < 0,05$) du BHB plasmatique par rapport aux animaux du groupe F (Tableau 8).

Tableau 8 : Effets des traitements par le fénofibrate ou par le régime cétogène sur le poids du foie (ratio) et la concentration plasmatique (mmol/L) en bêta hydroxybutyrate (BHB) dans les différents groupes (foie : contrôle n=8, KD n=7, F n=8, KDF n=10 ; BHB : contrôle n=11; KD n=8 ; F n=11; KDF n=11). Les résultats sont des moyennes +/- esm. Les différences intergroupes sont notées ■ $p < 0,001$ versus les groupes contrôle et KD, ● $p < 0,001$ versus les groupes contrôle et F, ▲ $p < 0,05$ versus le groupe contrôle.

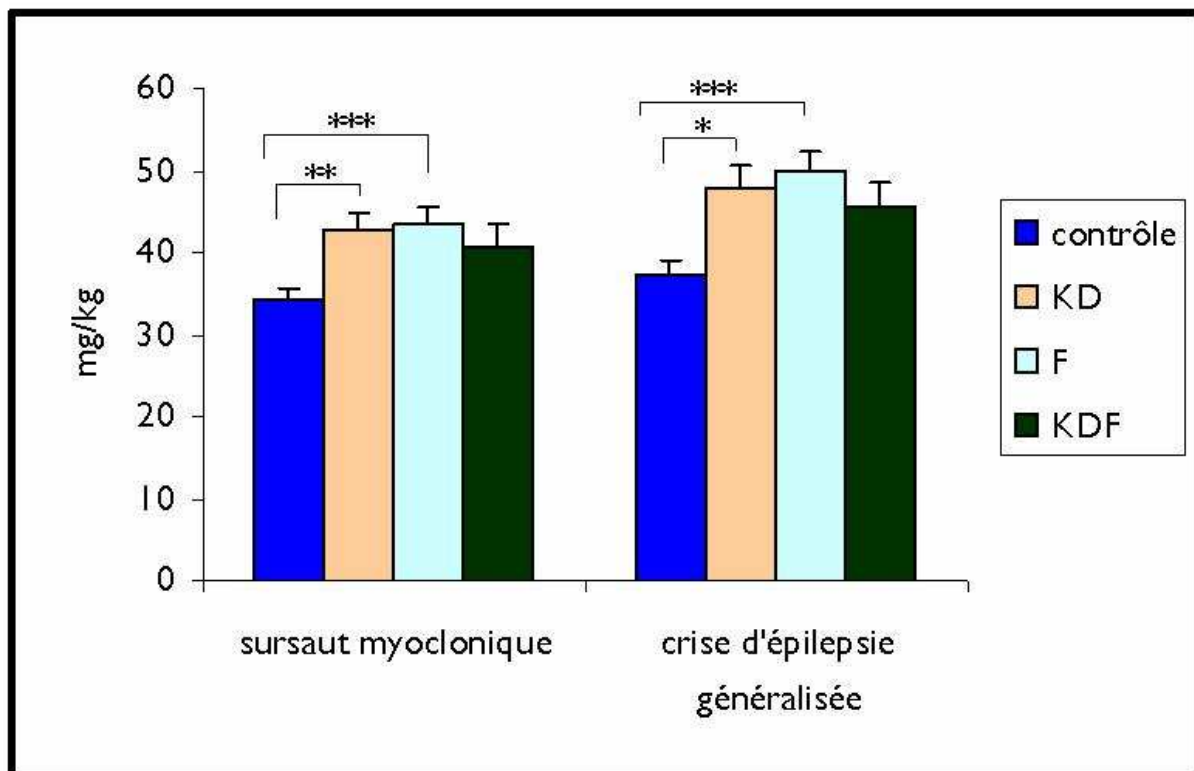
	ratio poids du foie / poids du corps	BHB plasmatique (mmol/L)
Contrôle	0,037 +/- 0,002	0,14 +/- 0,03
KD	0,04 +/- 0,003	1,25 +/- 0,25 [●]
F	0,064 +/- 0,004 [■]	0,22 +/- 0,03
KD+F	0,066 +/- 0,002 [■]	1,63 +/- 0,42 [▲]

Les seuils au PTZ pour l'apparition du premier sursaut myoclonique et de la crise épileptique généralisée étaient augmentés chez les animaux traités par le fénofibrate ou par le régime cétogène.

Les animaux traités par le régime cétogène ou par le fénofibrate présentaient une augmentation des seuils au PTZ ($p < 0,03$) pour l'apparition du premier sursaut myoclonique et

de la crise d'épilepsie généralisée. Les animaux du groupe KDF présentaient une tendance à l'augmentation des seuils au PTZ en comparaison au groupe contrôle pour une valeur de p proche de la significativité [$p \leq 0,08$] (Figure 22).

Figure 22 : Seuils au pentylènetétrazole pour l'apparition du premier sursaut myoclonique et de la crise d'épilepsie généralisée chez les animaux contrôle (n=8), KD (n=7), F (n=7) et KDF (n=10). Les résultats sont des moyennes +/- esm, exprimés en mg/kg. Les différences intergroupes sont notées * $p < 0,03$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,002$ versus le groupe contrôle.



Les latences pour l'apparition de la première décharge de pointes ondes durant au moins 5 minutes étaient augmentées chez les animaux traités par le fenofibrate ou par le régime cétoène.

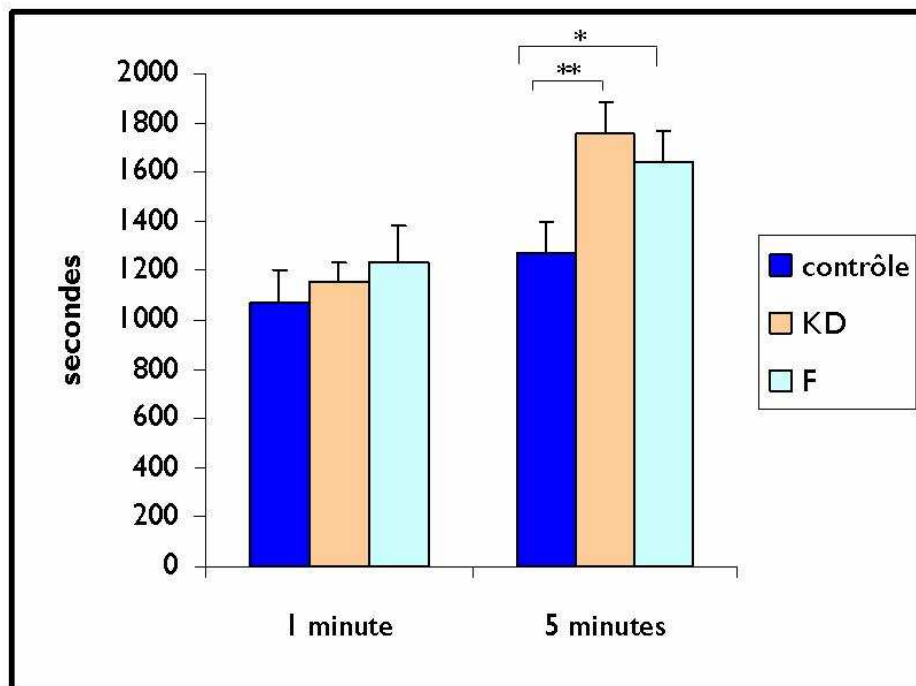
Les animaux traités par le régime cétoène ou par le fenofibrate présentaient une augmentation des latences pour l'apparition des premières décharges de pointes ondes d'une durée supérieure ou égale à 5 minutes ($p < 0,05$). En revanche, les latences pour obtenir l'apparition des premières décharges de pointes ondes d'une durée supérieure ou égale à

1 minute n'étaient pas différentes, quels que soient les traitements reçus par les animaux (Figure 23).

Chez tous les animaux étudiés, quel que soit le traitement, la première décharge de pointes ondes d'une durée supérieure ou égale à 5 minutes correspondait au début de l'état de mal épileptique.

La sévérité des crises épileptiques développées par les animaux n'était pas modifiée par le régime cétogène. Tous les animaux développaient des crises de stade 5 sur l'échelle de Racine (Racine, 1972).

Figure 23 : Latences d'apparition des premières décharges de pointes ondes de durées supérieures ou égales à 1 et à 5 minutes chez les animaux des groupes contrôle (n=8), KD (n=9) et F (n=9). Les résultats sont des moyennes +/- esm, exprimés en secondes. Les différences intergroupes sont notées : * p < 0,05 et ** p < 0,02 versus le groupe contrôle.



III. Conclusion

Nos résultats suggèrent que l'activation des récepteurs nucléaires PPAR-alpha a des propriétés anticonvulsivantes comparables à celles observées suite à un traitement par le régime cétogène. Ces propriétés anticonvulsivantes sont retrouvées dans deux modèles de crises épileptiques distincts, qui ne font pas appels aux mêmes mécanismes physiopathologiques.

Ces résultats suggèrent que le ou les mécanisme(s) d'action du régime cétogène pourraient reposer sur l'activation des récepteurs PPAR-alpha, qui sont, rappelons le, également activés par les AGPI. Les récepteurs PPAR-alpha pourraient agir via une modulation des voies inflammatoires ou encore via une modulation de l'expression génique.

Ce travail comporte toutefois des limites. Nous suggérons dans cette étude que l'activation des récepteurs nucléaires PPAR-alpha pourrait être responsable des propriétés anticonvulsivantes. Mais cela reste à démontrer par des analyses complémentaires : utilisation d'antagonistes ou de souris KO PPAR-alpha. Le fénofibrate pourrait avoir une action autre, non liée à l'activation du récepteur nucléaire PPAR-alpha. Si les récepteurs PPAR-alpha sont impliqués dans les propriétés anticonvulsivantes observées dans cette étude, il resterait à déterminer si les propriétés anticonvulsivantes du régime cétogène et/ou les AGPI sont liées à cette activation. Dans cette étude, nous n'avons utilisé qu'une seule posologie de fénofibrate qui a été décrite au préalable comme ayant des propriétés neuroprotectrices dans des modèles d'ischémie cérébrale et de maladie de Parkinson (Deplanque et al., 2003; Kreisler et al., 2007). Une étude complémentaire mériterait d'évaluer l'effet-dose du fénofibrate. Des interrogations subsistent également au sujet de l'inefficacité anticonvulsivante de l'association régime cétogène et fénofibrate. Seul une tendance était observée. Des régimes cétogènes de différents ratios mériteraient d'être associés à différentes posologies de fénofibrate afin de compléter ces premières observations.

Si ces résultats étaient confirmés, une simplification du régime cétogène pourrait être envisagée. De même, le choix de la molécule pour traiter les patients épileptiques souffrant d'une hyperlipémie pourrait également être orienté vers le fénofibrate.

Publication 2 :

**Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor-agonist,
exerts anticonvulsive properties**

Natacha Porta, Louis Vallée, Cécile Lecointe, Emmanuel Bouchaert,
Bart Staels, Régis Bordet, Stéphane Auvin

Epilepsia 2008, *in press*

Résultats cliniques

Partie III :

Comparaison de l'efficacité clinique du régime cétogène et du régime modifié d'Atkins, et analyses des concentrations plasmatiques en acides gras

L'objectif de ce travail était de comparer l'efficacité anticonvulsivante du régime cétogène et du régime modifié d'Atkins, et d'étudier les variations en acides gras plasmatiques en fonction de l'efficacité des régimes.

Méthodes utilisées : Etude rétrospective réalisée dans le service de Neuropédiatrie de Lille sur un échantillon de 27 enfants traités par le régime cétogène ou par le régime modifié d'Atkins entre septembre 2002 et juin 2008.

I. Méthodologies

1) Patients

Cette étude rétrospective a été réalisée dans le service de Neuropédiatrie de Lille. La population finale de l'étude était de 27 enfants souffrant d'une épilepsie pharmacorésistante et présentant au moins deux crises épileptiques par semaine, non contrôlées par les antiépileptiques. Avant de débiter cette étude, les patients avaient reçu au moins trois antiépileptiques et au moins une bithérapie. Tous les types de crises étaient acceptés. Aucun patient n'avait reçu au préalable un traitement par le régime cétogène ou par le régime modifié d'Atkins.

2) Protocole

La fréquence des crises épileptiques était déterminée par les notes des parents à l'introduction du traitement puis à 1, 3, 6 et 12 mois. Les patients qui présentaient une diminution de la fréquence des crises épileptiques inférieure ou égale à 50 % ne répondaient pas au traitement tandis que les patients qui présentaient une diminution de la fréquence des crises épileptiques supérieure à 50 % répondaient au traitement.

Un protocole de régime cétogène sans jeûne préalable était utilisé de septembre 2002 à janvier 2007. A partir de janvier 2007 les patients inclus recevaient le régime modifié d'Atkins. Le régime cétogène était introduit progressivement, sans jeûne ni restriction hydrique. La totalité des calories était donnée après trois jours (apport calorique journalier : jour 1 : 1/3 ; jour 2 : 2/3 et jour 3 : 3/3). Tous les patients recevaient un régime cétogène « classique » de ratios 4/1 à 3/1.

Le régime modifié d'Atkins est un régime sans restriction calorique qui apporte 60 % de lipides, 30 % de protéines et 10 % de glucides par kilogramme. Ce régime est introduit sans jeûne. Comme il est suggéré par Kossoff et al. (Kossoff et al., 2007) les glucides sont réduits à 10 grammes par jour le premier mois. Si le régime permet le contrôle des crises épileptiques et/ou si la restriction est mal tolérée par les patients, une augmentation des glucides de 5 grammes/jour est possible à partir du deuxième mois de traitement.

Pour permettre une bonne adaptation et un bon apprentissage des règles aux patients et aux familles, l'introduction des deux régimes se faisait dans le service pendant 3-4 jours.

Nous avons examiné les comptes-rendus des consultations de suivi à 1, 3, 6 et 12 mois de traitement pour relever l'efficacité des régimes et accéder aux dosages des acides gras plasmatiques.

3) Analyses des acides gras plasmatiques

Les échantillons de sang étaient collectés avant l'introduction du régime cétogène et du régime modifié d'Atkins, puis à 1, 3, 6 et 12 mois de traitement. Le prélèvement était réalisé le matin chez des patients à jeun. Après avoir ajouté un standard interne (C19 :0 ; 20,2 µg/mL) les lipides totaux étaient extraits du sérum avec un mélange chloroforme méthanol (2/1 V/V), en utilisant la méthode décrite par Folch et al. (FOLCH et al., 1957). Les lipides totaux étaient hydrolysés et méthylés avec de l'acide sulfurique et du méthanol. Les acides gras méthyl-esters obtenus étaient séparés par chromatographie en phase gazeuse (colonne : 30-m Supelco Omégawax™ 320 ; chromatographe : VARIAN 3400, Palo Alto, CA). Douze acides gras (C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2 n-6, C18:3 n-3, C20:3 n-6, C20:5 n-3, C20:3 n-9, C20:4 n-6, C22:6 n-3) étaient extraits. Les résultats sont exprimés en % des acides gras totaux (moyenne +/- l'écart standard à la moyenne). Les dosages ont été réalisés dans le service de Biochimie de l'hôpital de Lille.

4) Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel SPSS version 15 (LEAD Technologies, Chicago, IL). Les résultats exprimés en médiane et en moyenne étaient analysés selon un test non paramétrique de Mann et Whitney. Les données concernant l'efficacité des régimes ont été analysées selon un test de Fisher exact. Les valeurs étaient reconnues significativement différentes pour une valeur de $p < 0,05$.

II. Résultats

Données démographiques

27 patients étaient inclus dans cette étude : 15 garçons et 12 filles traités dans le service de Neuropédiatrie de Lille entre septembre 2002 et juin 2008 (6 patients sont encore en traitement). 17 patients recevaient le régime cétogène de septembre 2002 à janvier 2007, et 10 patients recevaient le régime modifié d'Atkins à partir de janvier 2007. Pour deux patients (7 et 8) le régime cétogène était remplacé par le régime modifié d'Atkins après respectivement 5 et 11 mois de traitement, sans modification de l'efficacité.

Les types d'épilepsies et leurs étiologies sont présentés dans le tableau 9. L'âge médian de début d'épilepsie était de 6 mois (de la naissance à 66 mois). Les patients présentaient des épilepsies réparties comme suit : 30 % de spasmes infantiles (8/27), 56 % d'épilepsie partielle (15/27), 11 % d'épilepsie généralisée (3/27) et 3 % de syndrome de Lennox Gastaut (1/27). Un nombre médian de 7 antiépileptiques avait échoué avant l'introduction du régime cétogène ou du régime modifié d'Atkins.

L'âge médian à l'introduction du régime cétogène était de 32 mois (allant de 11 à 153 mois) et de 77 mois (allant de 4 à 182 mois) pour le régime modifié d'Atkins. Les patients recevaient un nombre médian de 3 antiépileptiques (allant de 2 à 4) au cours du traitement par le régime cétogène ou par le régime modifié d'Atkins (tableau 10).

Tableau 10: Comparaison des données démographiques pour le régime cétogène et le régime modifié d'Atkins. [AE = antiépileptique]

	Régime modifié d'Atkins	Régime cétogène
Patients	10	17
AE avant le régime	7	6
Age du début de traitement (mois)	77	32
Durée du traitement (mois)	3	5
Encore sous traitement	5	1
Nombre d'AE à l'initiation du régime	3	3

Tableau 9: Données démographiques concernant les 27 patients inclus dans cette étude.

Patient n°	Sexe	Début de l'épilepsie (année)	Type d'épilepsie (a)	Etiologie ou syndrome épileptique	Type de régime (b)	Age à l'initiation du régime	AE avant le régime	Durée de traitement (mois) (b)	AE au début du traitement (c)
1	F	0.1	IS	Délétion 1p36	KD	0.11	5	9	VGB, TPM
2	M	0.4	P	Encéphalopathie anoxo ischémique	KD	1.8	5	1	VGB, TPM
3	F	1.4	P	Cryptogénique	Atkins	15.2	14	1	OxCBZ, BZ
4	F	4	P	Syndrome de Sturge Weber	Atkins	5.10	8	→	LEV, VGB, STP
5	M	3	IS	Inconnu	Atkins	6.1	8	1	VPA, GBP
6	F	2 jours	P	Hémimégalencéphalie droite	KD	1.5	4	3	VGB, BP, BZ
7	M	15 jours	P	Cryptogénique	KD→A	0.3	6	→	VGB, BZ, STP
8	M	0.5	IS	Défaut chaîne respiratoire mitochondriale	KD→A	2.1	5	→	BZ, VGB, LTG
9	F	3	G	Cryptogénique	Atkins	9.8	5	3	VPA, LEV, LTG
10	M	0.6	IS →LG	Sclérose tubéreuse	KD	3.3	6	12	VGB, PHT, BZ
11	M	0.5	P	Encéphalopathie anoxo ischémique	KD	2.5	7	12	PHT, LTG
12	M	1.8	G	Inconnu	KD	8.10	7	6	LTG, VPA
13	F	Naissance	P	Malformation complexe	Atkins	0.4	3	4	VGB, TPM
14	F	2.7	G	Inconnu	Atkins	10.3	7	3	ETH, LTG, BZ, VPA
15	F	0.5	IS →LG	Encéphalopathie virus Herpès	Atkins	9.2	12	3	ETH, TPM, BZ, FLB
16	F	1.4	P	Dysplasie corticale frontale	KD	2.7	10	4	STP, BZ, ETH
17	F	0.11	P	Encéphalopathie anoxo ischémique	Atkins	6.9	7	→	LEV, BZ, LTG, TPM
18	M	0.2	P	Cryptogénique	Atkins	1.3	4	→	TPM, STP, BZ
19	M	0.5	IS	Cryptogénique	KD	2	9	12	VPA, LTG, GBP
20	F	0.8	P	Cryptogénique	KD	3.1	6	2	LTG, TPM
21	F	0.1	P	Cryptogénique	KD	5.4	11	12	FLB, LTG, BZ
22	M	5.6	EPC	Défaut chaîne respiratoire mitochondriale	KD	12.4	7	→	ETH, TPM, BZ, STP
23	M	0.6	IS	Sclérose tubéreuse	Atkins	0.9	5	2	LTG, HC, VGB
24	F	0.8	LG	Encéphalopathie virus Herpès	KD	12.9	14	4	TPM, FLB, ETH
25	F	1.1	P	Inconnu	KD	2.8	6	3	TPM, STP
26	M	0.2	IS	Lissencéphalie	KD	2.8	7	3	VGB, TPM, LTG
27	F	3	P	Syndrome de Sturge Weber	KD	3.1	6	24	TPM, LTG, BZ

(a) **P** : épilepsie partielle; **G** : épilepsie généralisée; **LG** : syndrome de Lennox Gastaut; **EPC** : épilepsie partielle continue, **IS** : spasmes infantiles

(b) → en cours; **KD** : régime cétogène ; **KD →A** : régime cétogène remplacé par le régime modifié d'Atkins

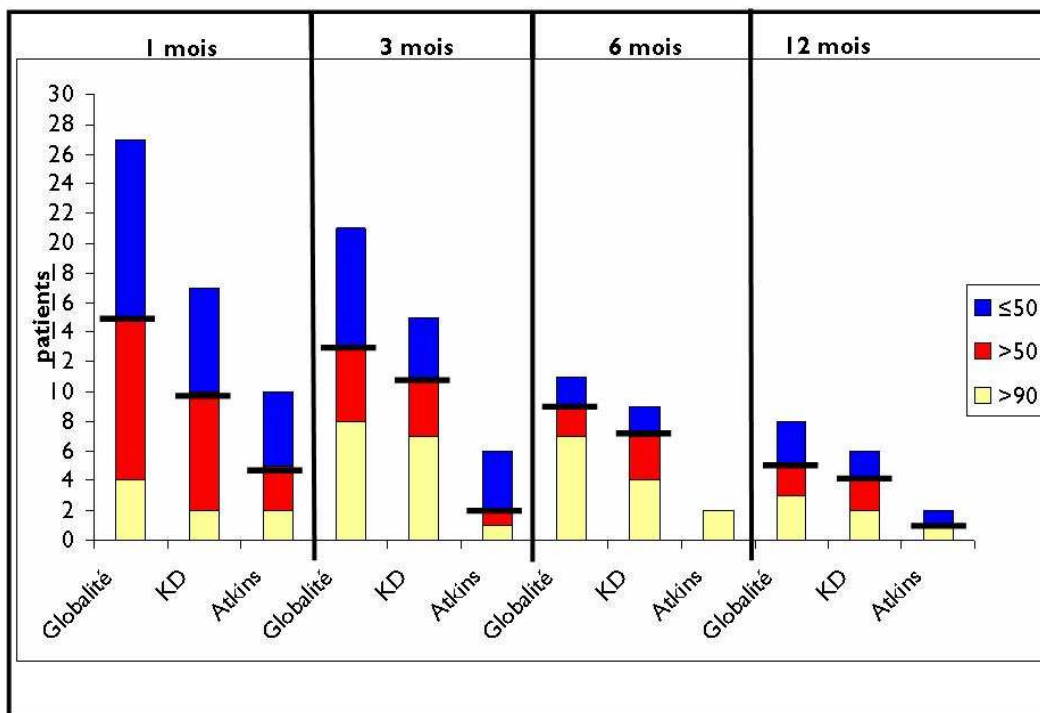
(c) **AE** (antiépileptique) : **VGB** : vigabatrin; **TPM** : topiramate; **PB** : pentobarbital; **BZ** : benzodiazépine; **PHT** : phénytoïne; **LTG** : lamotrigine; **VPA** : acide valproïque; **STP** : stiripentol; **CBZ** : carbamazépine; **ETH** : éthosuximide; **FLB** : felbamate; **LEV** : lévétiracetam; **OxCBZ** : oxcarbazépine; **GBP** : gabapentine; **HC** : hydrocortisone

Efficacité des traitements et durée

Tous les patients inclus suivaient le régime cétogène ou le régime modifié d'Atkins pendant au moins un mois. Actuellement, un patient est encore traité par le régime cétogène (> 12 mois) et cinq patients sont encore traités par le régime modifié d'Atkins. La durée médiane de traitement était de 5 mois (allant de 1 à 24) pour le régime cétogène et de 3 mois (allant de 1 à 6) pour le régime modifié d'Atkins. Après 12 mois de traitement, 29 % des patients étaient traités par le régime cétogène et 20 % par le régime modifié d'Atkins.

Après un mois, 10/17 des patients (59 %) recevant le régime cétogène avaient une amélioration de la fréquence des crises épileptiques > 50 % en comparaison à 5/10 (50 %) des patients recevant le régime modifié d'Atkins ($p = 0,28$). Après trois mois, 11/17 des patients (64 %) recevant le régime cétogène présentaient une amélioration de la fréquence des crises > 50 % en comparaison à 2/10 (20 %) des patients recevant le régime modifié d'Atkins ($p = 0,03$). Après 6 mois, 7/17 des patients (41 %) versus 2/10 des patients (20 %) présentaient une amélioration de la fréquence des crises épileptiques > 50 % ($p = 0,24$). L'ensemble de ces résultats est présenté figure 24.

Figure 24 : Efficacité du régime cétogène et du régime modifié d'Atkins après 1, 3, 6 et 12 mois de traitement.



Les raisons de l'arrêt du traitement sont reportées dans le tableau 11, pour les patients traités par régime cétogène (10/17) et par le régime modifié d'Atkins (5/10). Le nombre d'antiépileptiques avant et après la mise en place des deux régimes n'était pas différent. La survenue d'un état de mal épileptique diminuait significativement après la mise en place des régimes. Avant le traitement, il y avait une médiane de 1 état de mal épileptique (allant de 0 à 12) et après le traitement le nombre médian était de 0 (allant de 0 à 2).

Tableau 11 : Raisons de l'arrêt du traitement pour le régime cétogène et le régime modifié d'Atkins.

	Régime modifié d'Atkins	Régime cétogène
Nombre d'arrêt	5/10	10/17
Libre de crise	0	3
Inefficacité	4	7
et/ou intolérance	2	1

Concentrations en acides gras plasmatiques : les acides linoléique et alpha linoléique augmentaient au cours des régimes

Les analyses de la composition du plasma en acides gras étaient réalisées avant l'introduction des régimes puis à 1, 3, 6 et 12 mois, chez respectivement 17, 15, 12, 7 et 4 patients. Des changements significatifs étaient observés (figures 25 A et B). Les acides gras n-6 et n-3 : acides linoléique (LA ; C18:2 n-6) et alpha linoléique (ALA ; C18:3 n-3) contenus dans les acides gras totaux plasmatiques étaient augmentés après 1, 3, 6 et 12 mois de régime. En revanche les acides gras : homo linoléique (Homo-Lino C20:3 n-6), arachidonique (AA; C20:4 n-6), eicosapentaénoïque (EPA; C20:5 n-3), docosahexaénoïque (DHA, C22:6 n-3) et eicosatriénoïque (Mead, C20:3 n-9) contenus dans les acides gras totaux plasmatiques n'étaient pas modifiés après 1, 3, 6 et 12 mois de régime. Une réduction significative de l'acide palmitoléique (C16 :1) contenu dans les acides gras totaux plasmatiques était observée après 1, 6 et 12 mois de régime. Les acides gras saturés n'étaient pas modifiés au cours des régimes.

Figure 25 A : Acides gras saturés et mono-insaturés à l'introduction du régime cétogène et du régime modifié d'Atkins (n=17) puis à 1 (n=15), 3 (n=12), 6 (n=7) et 12 (n=4) mois de traitement. Les résultats sont des moyennes +/- esm, exprimés en % des acides gras totaux. Les différences intergroupes étaient notées * p < 0,05 en comparaison avec J0. [Myristic : acide myristique (C14:0); Palmitic : acide palmitique (C16:0); Palmitoleic : acide palmitoléique (C16:1); Stearic : acide stéarique (C18:0); Oleic : acide oléique (C18:1); LA+ALA : acide linoléique (C18:2 n-6) + acide alpha linoléique (C18:3 n-3); Homo Lino : acide homo linoléique (C20:3 n-6); EPA : acide eicosapentaénoïque (C20:5 n-3); Mead : acide eicosatriénoïque (C20:3 n-9); AA : acide arachidonique (C20:4 n-6); DHA : acide docosahexaénoïque (C22:6 n-3)].

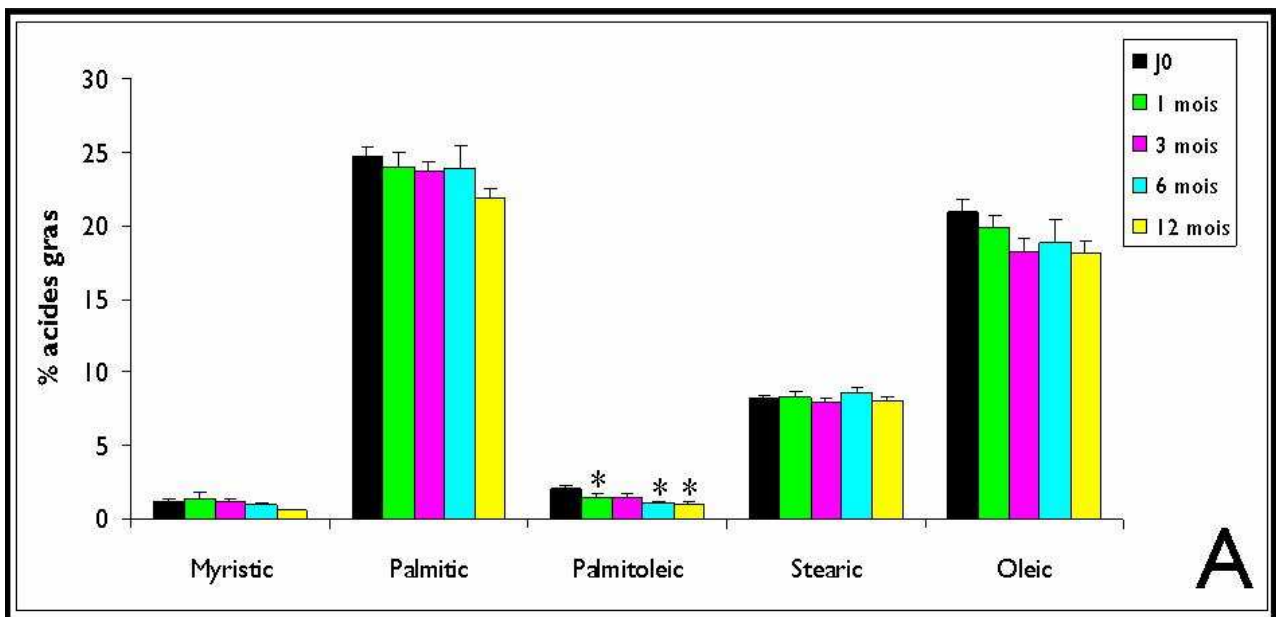
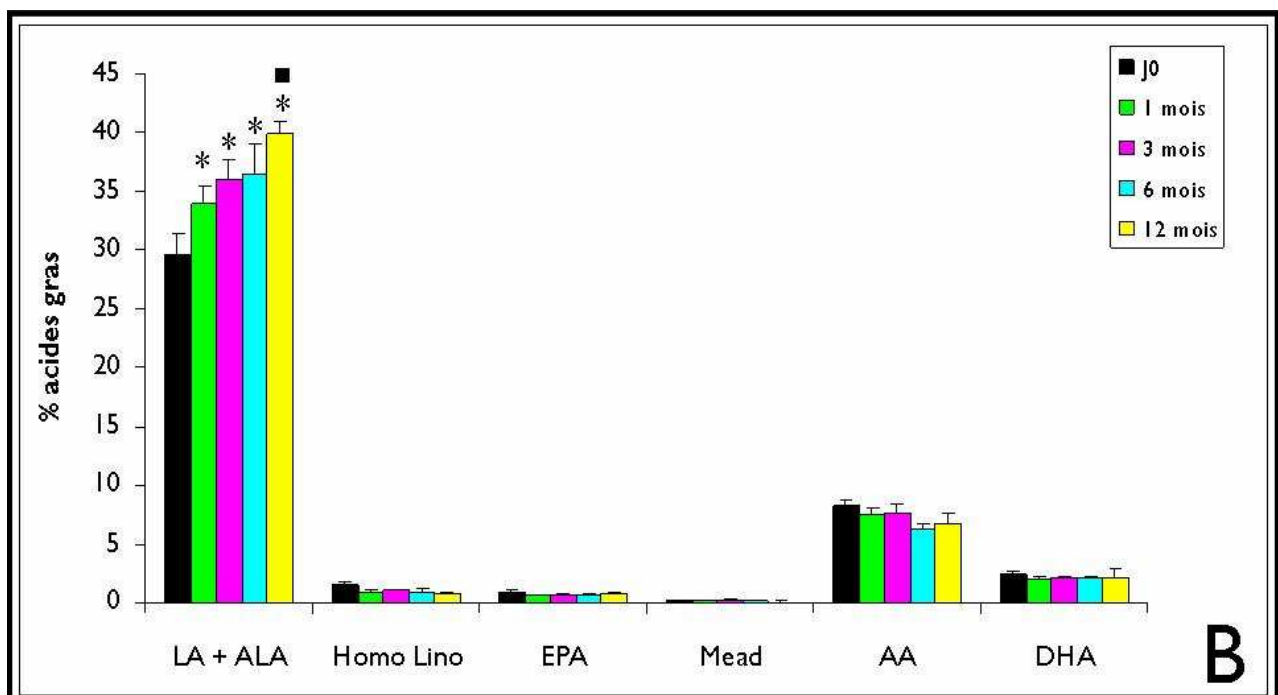


Figure 25 B : Acides poly-insaturés à l'introduction du régime cétogène et du régime modifié d'Atkins (n=17) puis à 1 (n=15), 3 (n=12), 6 (n=7) et 12 (n=4) mois de traitement. Les différences intergroupes étaient notées * $p < 0,05$ en comparaison avec J0 et ■ $p < 0,02$ en comparaison avec un mois. Les résultats sont des moyennes +/- esm, exprimés en % des acides gras totaux. [Myristic : acide myristique (C14:0); Palmitic : acide palmitique (C16:0); Palmitoleic : acide palmitoléique (C16:1); Stearic : acide stéarique (C18:0); Oleic : acide oléique (C18:1); LA+ALA : acide linoléique (C18:2 n-6) + acide alpha linoléique (C18:3 n-3); Homo Lino : acide homo linoléique (C20:3 n-6); EPA : acide eicosapentaénoïque (C20:5 n-3); Mead : acide eicosatriénoïque (C20:3 n-9); AA : acide arachidonique (C20:4 n-6); DHA : acide docosahexaénoïque (C22:6 n-3)].



Concentrations en acides gras plasmatiques et efficacité des traitements : les patients qui répondaient aux régimes présentaient une diminution de la concentration plasmatique en AA et DHA

Les concentrations de chaque acide gras étaient comparées après un et trois mois de traitement selon si les patients répondaient (> 50) ou pas (≤ 50) aux régimes (figures 26 A et 26 B).

Après un mois de traitement, les patients répondant ($n=7$) aux régimes présentaient une augmentation significative de l'acide palmitoléique plasmatique (acides gras totaux), et une diminution significative de l'AA contenu dans les acides gras totaux plasmatiques en comparaison aux patients qui ne répondaient pas aux régimes ($n=8$). Les valeurs pour l'AA étaient $5,57 \pm 0,73$ % chez les patients qui répondaient et $9,06 \pm 0,81$ % chez ceux qui ne répondaient pas au traitement. Une tendance à la diminution était observée pour l'EPA contenu dans les acides gras totaux plasmatiques ($p = 0,06$) chez les patients qui répondaient aux régimes.

Après trois mois de traitement, les patients répondant ($n=6$) aux régimes présentaient une diminution significative de l'AA et du DHA contenus dans les acides gras totaux plasmatiques en comparaison aux patients qui ne répondaient pas aux régimes ($n=6$). Les valeurs pour l'AA étaient $6,17 \pm 0,63$ % chez les patients qui répondaient au traitement et $8,99 \pm 1,10$ % chez ceux qui ne répondaient pas. Pour le DHA ces valeurs étaient respectivement de $1,77 \pm 0,23$ % et $2,46 \pm 0,15$ %.

Les concentrations en LA et en ALA plasmatiques (acides gras totaux) n'étaient pas modifiées chez les patients répondant ou pas aux régimes.

Figure 26 A : Concentrations en acides gras saturés, mono-insaturés et poly-insaturés après un mois de régime cétogène ou de régime modifié d'Atkins chez les patients qui répondaient (n=7) ou pas (n=8) aux régimes. Les résultats sont des moyennes +/- esm, exprimés en % des acides gras totaux. Les différences intergroupes étaient notées * p < 0,05. [Myristic : acide myristique (C14:0); Palmitic : acide palmitique (C16:0); Palmitoleic : acide palmitoléique (C16:1); Stearic : acide stéarique (C18:0); Oleic : acide oléique (C18:1); LA+ALA: acide linoléique (C18:2 n-6) + acide alpha linoléique (C18:3 n-3); Homo Lino : acide homo linoléique (C20:3 n-6); EPA : acide eicosapentaénoïque (C20:5 n-3); Mead : acide eicosatriénoïque (C20:3 n-9); AA : acide arachidonique (C20:4 n-6); DHA : acide docosahexaénoïque (C22:6 n-3).]

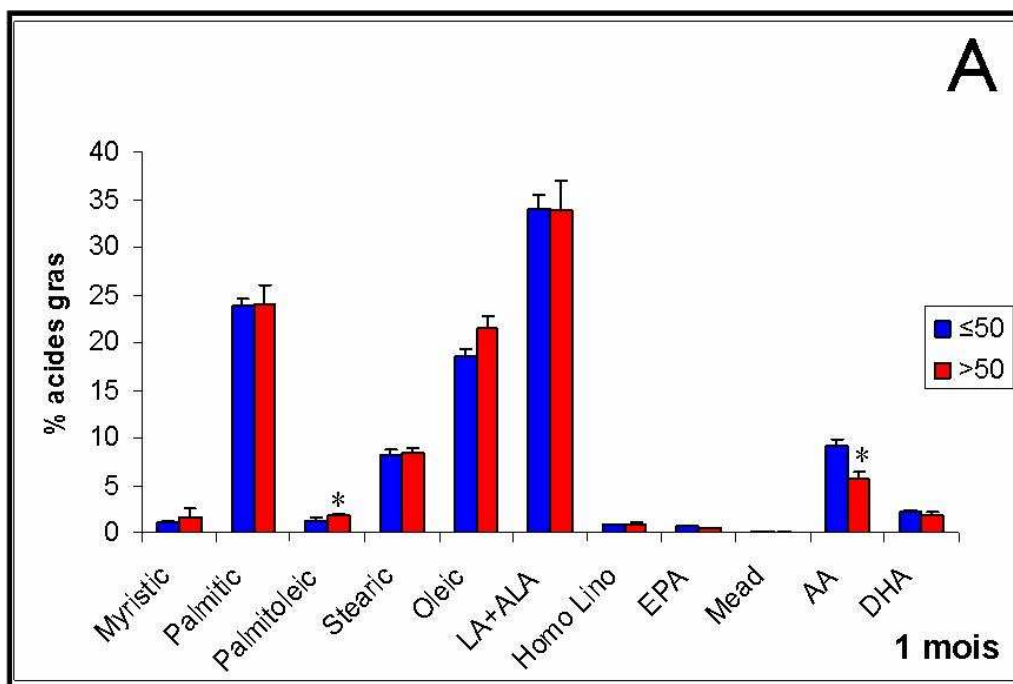
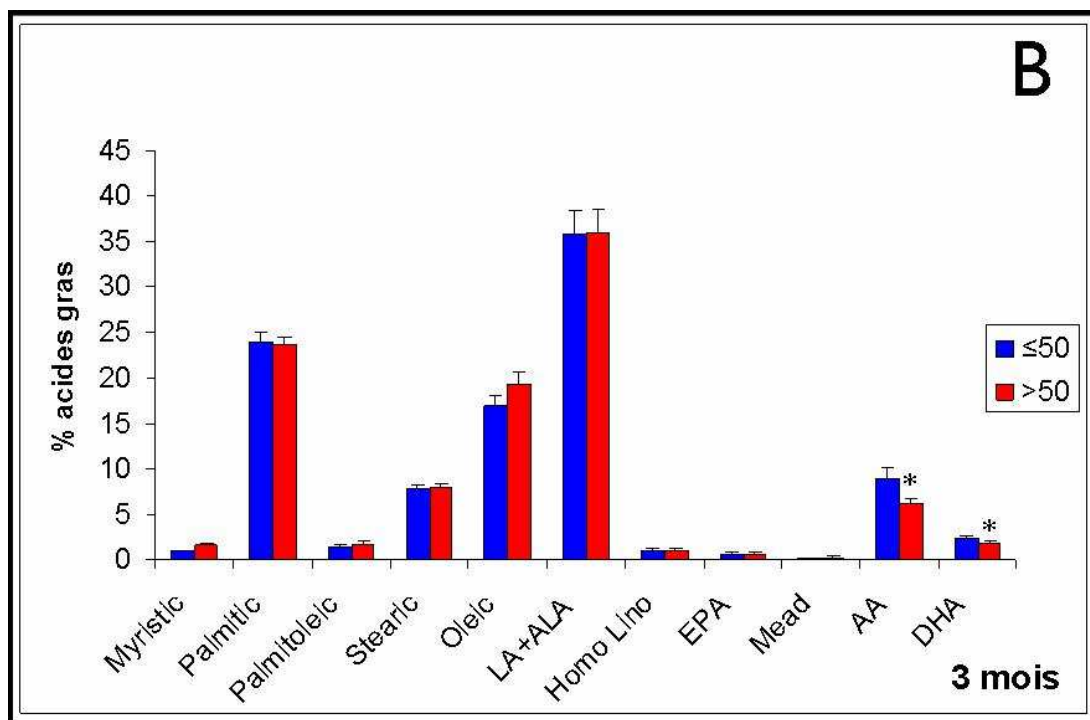


Figure 26 B: Concentrations en acides gras saturés, mono-insaturés et poly-insaturés après trois mois de régime cétogène ou de régime modifié d'Atkins chez les patients qui répondaient (n=6) ou pas (n=6) aux régimes. Les résultats sont des moyennes +/- esm, exprimés en % des acides gras totaux. Les différences intergroupes étaient notées * p < 0,05. [Myristic : acide myristique (C14:0); Palmitic : acide palmitique (C16:0); Palmitoleic : acide palmitoléique (C16:1); Stearic : acide stéarique (C18:0); Oleic : acide oléique (C18:1); LA+ALA: acide linoléique (C18:2 n-6) + acide alpha linoléique (C18:3 n-3); Homo Lino : acide homo linoléique (C20:3 n-6); EPA : acide eicosapentaénoïque (C20:5 n-3); Mead : acide eicosatriénoïque (C20:3 n-9); AA : acide arachidonique (C20:4 n-6); DHA : acide docosahexaénoïque (C22:6 n-3).]



III. Conclusion

Le régime cétogène et le régime modifié d'Atkins semblent exercer une efficacité antiépileptique comparable dans la prise en charge des épilepsies pharmacorésistantes. Les différences observées entre ces deux régimes, au sujet de l'âge d'introduction et des durées de traitement peuvent être d'une part liées au fait que la méthodologie est rétrospective, et d'autre part s'expliquer par le fait que l'utilisation du régime modifié d'Atkins dans notre service est plus récente (janvier 2007) que celle du régime cétogène (septembre 2002 à janvier 2007). Si ces résultats sont confirmés par de futures études, le régime cétogène pourrait être remplacé par le régime modifié d'Atkins qui est moins contraignant, moins restrictif et mieux toléré par les patients (Kang et al., 2007a). Notre étude rapporte également que le remplacement du régime cétogène par le régime modifié d'Atkins chez deux patients ne modifiait pas l'efficacité antiépileptique du traitement. Cet aspect devrait être davantage exploré, ce qui permettrait d'évaluer le bénéfice de remplacer le régime modifié d'Atkins par le régime cétogène chez les patients ne répondant pas au régime modifié d'Atkins, ou de remplacer le régime cétogène par le régime modifié d'Atkins chez les patients qui ne tolèrent pas le premier. Toujours dans l'optique de diminuer les effets indésirables liés au traitement antiépileptique, une évaluation de la prise en charge thérapeutique par le régime modifié d'Atkins des épilepsies non pharmacorésistantes mériterait d'être réalisée, celui-ci étant plus facilement accepté par les familles et les patients que le régime cétogène.

Dans notre étude, il était également retrouvé une réduction significative du nombre d'états de mal épileptique chez les patients suite à l'introduction du régime cétogène ou du régime modifié d'Atkins. Ces deux régimes pourraient avoir un rôle dans la prévention des états de mal épileptiques. L'aspect préventif mériterait d'être davantage exploré car chez les enfants présentant des états de mal épileptiques répétés le risque de mortalité est augmenté. Une étude rapportait également le succès de la prise en charge d'un état de mal épileptique réfractaire par le régime cétogène chez un patient adulte (Bodenant et al., 2008). Des études complémentaires devraient explorer l'efficacité de la prise en charge des états de mal épileptiques réfractaires par le régime cétogène ou par le régime modifié d'Atkins qui ont l'avantage de présenter moins d'effets secondaires que le pentobarbital (Holmes and Riviello, Jr., 1999).

Au cours de ces deux régimes, une augmentation du LA et l'ALA était observée après 1, 3, 6 ou 12 mois de traitement. En revanche, il n'y avait pas de modification des autres AGPI. Quand les patients étaient séparés selon le critère « réponse » ou « non réponse » au

traitement, après un et trois mois de traitement, des modifications étaient observées. Les patients qui répondaient au traitement présentaient une diminution significative de l'AA après un et trois mois de traitement ainsi qu'une diminution du DHA après trois mois de traitement. Nos résultats diffèrent des études cliniques précédentes (Dahlin et al., 2007;Fraser et al., 2003). Des investigations complémentaires sont donc nécessaires pour déterminer si les variations plasmatiques en AA et en DHA sont liées au pouvoir anticonvulsivant du traitement ou si ces variations sont le reflet de la composition lipidique des différents régimes (Kossoff and McGrogan, 2005).

Publication 3 :

**Comparison of seizure reduction and serum fatty acid levels after
receiving the ketogenic and modified Atkins diet**

Natacha Porta, Louis Vallée, Elisabeth Boutry, Monique Fontaine,
Anne-Frédérique Dessen, Sylvie Joriot, Jean-Marie Cuisset,
Jean-Christophe Cuvellier, Stéphane Auvin

Epilepsy and Behavior 2008, *soumis*

Chapitre V : discussion

DISCUSSION

I. Vers une simplification du régime cétogène : le régime modifié d'Atkins

Nous avons vu dans notre étude que les efficacités antiépileptiques du régime modifié d'Atkins et du régime cétogène étaient comparables. Ces données sont en faveur d'une plus large utilisation du régime modifié d'Atkins chez les patients, en remplacement du régime cétogène trop contraignant et parfois mal toléré.

1) Efficacité du régime modifié d'Atkins

Dans notre étude, l'efficacité antiépileptique décrite pour le régime modifié d'Atkins était comparable à celle du régime cétogène. Mais elle était également comparable à l'efficacité antiépileptique du régime modifié d'Atkins décrite dans les études américaines et asiatiques (Kang et al., 2007a; Kossoff et al., 2006). Une efficacité antiépileptique du régime modifié d'Atkins était rapportée dans ces deux études, menées chez respectivement 14 et 20 enfants. Après un mois de traitement, respectivement 57 % et 69 % des patients présentaient une amélioration de la fréquence des crises épileptiques supérieure à 50 %. Nous rapportons aussi une efficacité du régime modifié d'Atkins chez 50 % des patients. Nos résultats à trois et six mois (efficacité retrouvée chez 20 % des patients) sont inférieurs à ce qui est décrit dans les études américaines et asiatiques (trois mois : efficacité pour 36 % et 60 % des patients, six mois : efficacité pour 65 % et 56 % des patients). Cette différence peut être expliquée par le fait qu'à ces deux temps, le nombre de patients traités par le régime modifié d'Atkins était faible (respectivement 6 et 2 patients).

Dans notre étude, l'efficacité antiépileptique n'était pas modifiée chez les deux patients qui ont changé de traitement (remplacement du régime cétogène par le régime modifié d'Atkins). Cette même observation a été rapportée pour un patient dans une étude précédente (Kossoff et al., 2003). L'effectif est certes minime mais si un tel argument était confirmé par d'autres études, il pourrait être envisagé de débiter le traitement par un régime cétogène chez les patients ne répondant pas ou peu au régime modifié d'Atkins et d'effectuer une transition plus tardive vers le régime modifié d'Atkins pour augmenter la tolérance des patients.

2) Avantages du régime modifié d'Atkins

Le régime cétogène est un traitement efficace mais contraignant. Suite aux précédentes observations concernant l'efficacité antiépileptique du régime modifié d'Atkins, un remplacement du régime cétogène par le régime modifié d'Atkins serait bénéfique pour les patients et leur famille.

Le régime modifié d'Atkins présente de nombreux avantages qui font qu'il est mieux toléré par les patients : absence de restriction calorique, apports en glucides contrôlés mais possibles, aliments et repas plus variés. Ces caractéristiques rendent le régime modifié d'Atkins moins restrictif que le régime cétogène. Ainsi la tolérance et l'acceptation peuvent être augmentées chez les patients et les familles. Le régime modifié d'Atkins semble également une alternative thérapeutique pour les adolescents et les adultes souffrant d'une épilepsie pharmacorésistante (Carrette et al., 2008;Kang et al., 2007a;Kossoff et al., 2008b) pour lesquels le régime cétogène est souvent décrit comme contraignant et mal toléré (Mady et al., 2003;Sirven et al., 1999).

Un des autres avantages du régime modifié d'Atkins est que les apports en glucides peuvent évoluer au cours du traitement. A l'introduction du régime modifié d'Atkins, l'apport en glucides est limité à 10 g/jour mais cet apport peut être augmenté progressivement chez les patients qui ne tolèrent pas la restriction et/ou chez les patients qui répondent bien au traitement. Les études menées jusqu'à ce jour renaient une augmentation des apports de 5 g/jour sur une période d'un mois. La limite supérieure des apports en glucides étant fixée à 20 g/jour (Carrette et al., 2008;Kang et al., 2007a;Kossoff et al., 2007).

L'ensemble des avantages du régime modifié d'Atkins, et la diminution des contraintes par rapport au régime cétogène font que ce traitement ne devrait plus être considéré comme le traitement de la dernière chance. De plus, l'évaluation de son efficacité anticonvulsivante devrait se généraliser aux épilepsies non pharmacorésistantes car les effets indésirables liés à une modification alimentaire pourraient être restreints par rapport à ceux pouvant être induits par un traitement médicamenteux.

3) Limites de cette étude

Des études complémentaires méritent d'être réalisées car notre étude présente des limites. Ces limites sont d'une part le fait que l'étude est rétrospective, et d'autre part que

l'utilisation du régime modifié d'Atkins est récente dans notre service. Ces deux facteurs font que les groupes ne sont pas homogènes en terme d'âge à l'introduction du traitement et en terme de durée de traitement. Les comparaisons d'efficacité à 6 et 12 mois de traitement entre le régime cétogène et le régime modifié d'Atkins n'étaient pas représentatives compte tenu du faible nombre de patients traités par le régime modifié d'Atkins pour ces temps.

Les prochaines études cliniques devraient tenir compte de nos résultats au sujet des propriétés anticonvulsivantes des AGPI. L'association d'un apport alimentaire en ALA + LA et d'un traitement par le régime cétogène ou le régime modifié d'Atkins devrait être évaluée.

II. Vers des alternatives au régime cétogène

Comme nous l'avons décrit précédemment, le régime cétogène est un traitement contraignant, et la compliance est difficile à maintenir dans le temps. Nos travaux avaient pour objectif de trouver des alternatives au régime cétogène. Pour cela, nous avons évalué les effets anticonvulsivants d'un apport entérale en AGPI, et d'un traitement par un agoniste des récepteurs PPAR-alpha.

1) Les AGPI

Nous retrouvons que l'apport quotidien du mélange ALA/LA pendant 30 jours avait des effets anticonvulsivants comparables à ceux du régime cétogène. Toutefois, de tels effets n'étaient pas retrouvés lors de l'administration du mélange LCP, alors que la quantité d'AGPI apportée quotidiennement était comparable à celle apportée par le mélange ALA/LA.

Les précédents travaux rapportaient que des traitements par des AGPI chez les rongeurs avaient des propriétés anticonvulsivantes. Ces effets étaient décrits suite à l'administration du mélange SR-3 (40 mg/kg, i.p.) pendant 21 jours (Rabinovitz et al., 2004; Yehuda et al., 1994), et cette action a été récemment décrite comme étant dose-dépendante (Taha et al., 2008a). Toutefois, plusieurs études ne retrouvaient pas de tels effets pour le mélange SR-3 (Taha et al., 2005; Taha et al., 2008a) ou pour un apport alimentaire d'EPA ou de DHA pendant 28 jours (Willis et al., 2008). L'efficacité anticonvulsivante des AGPI a aussi été décrite dans des modèles d'administration unique (40 µM, i.v. ou 10 µM, i.c.v.). L'EPA, le DHA et l'ALA avaient des propriétés anticonvulsivantes dans des modèles de crises épileptiques induites par une stimulation corticale ou par le kaïnate (35 mg/kg, i.p.) chez

des rats (Lauritzen et al., 2000; Voskuyl et al., 1998). Cependant, ces effets étaient décrits comme transitoires et ils disparaissaient 24 heures après l'injection des AGPI (Voskuyl et al., 1998).

Les résultats des études *in vitro* étaient concordants avec les effets anticonvulsivants décrits dans les études *in vivo*. Dans les études *in vitro*, l'application de DHA ou d'EPA (20, 50 ou 100 μM) sur des tranches hippocampiques diminuait l'excitabilité des neurones des aires CA1 et CA3 (Xiao and Li, 1999; Young et al., 2000). Cette modification de l'excitabilité intervenait via une diminution de la fréquence, et du nombre de potentiel d'action émis par les neurones de CA1 et CA3 suite une stimulation chimique (glutamate 200 μM , PTZ 200 μM , bicuculline 10 μM ou milieu dépourvu en magnésium) ou électrique (Xiao and Li, 1999; Young et al., 2000). L'application d'AGPI dans le milieu de culture contribuait également à moduler le potentiel de repos des neurones de CA1, en le rendant plus hyperpolarisé (Xiao and Li, 1999).

L'efficacité anticonvulsivante d'un apport entérale de mélanges DHA + EPA ou DHA + EPA + ALA était aussi décrite en clinique, chez des patients souffrant d'une épilepsie pharmacorésistante. Deux études sur trois rapportaient l'efficacité anticonvulsivante des AGPI (Bromfield et al., 2008; Schlanger et al., 2002; Yuen et al., 2005). L'apport de 3,25 g/jour d'AGPI (DHA + EPA + ALA) diminuait la fréquence des crises épileptiques après six mois de traitement chez 5/21 patients qui terminaient l'étude (Schlanger et al., 2002). De même, que l'apport journalier d'un mélange EPA + DHA (1,7 g/jour) diminuait la fréquence des crises épileptiques chez 15/29 des patients, mais de façon transitoire (Yuen et al., 2005). Les effets anticonvulsivants étaient observés pendant six semaines, mais ils n'étaient pas retrouvés à la douzième semaine. Finalement, l'administration d'un mélange EPA + DHA (2,2 mg/jour) n'avait pas d'effet anticonvulsivant chez les patients pendant 12 semaines de traitement.

L'ensemble de ces résultats suggère qu'un apport d'AGPI puisse avoir des effets anticonvulsivants. Ces effets sont rapportés par plusieurs études chez le rongeur, mais cela reste à préciser car certaines études sont contradictoires. Le poids des résultats *in vivo* en faveur d'une action anticonvulsivante des AGPI est augmenté par le fait que les AGPI sont capables de diminuer l'excitabilité cérébrale. Finalement, les études cliniques sont peu nombreuses mais deux d'entre-elles rapportaient les effets anticonvulsivants d'apport en AGPI via l'alimentation. Ces résultats restent à confirmer et à préciser car les effectifs permettant l'évaluation sont faibles, les apports lipidiques alimentaires ne sont pas contrôlés et les paramètres biochimiques ne sont pas ou peu explorés (AGPI plasmatiques, triglycérides, cholestérol....).

2) Le fénofibrate

Dans notre étude, un traitement de 14 jours par le fénofibrate avait des propriétés anticonvulsivantes comparables à celles obtenues après 14 jours de traitement par le régime cétogène.

Le fénofibrate est un agoniste direct des récepteurs PPAR-alpha. A ce jour, une seule étude a rapporté les effets anticonvulsivants d'un traitement par des statines (agoniste indirect des récepteurs PPAR-alpha) dans un modèle d'état de mal épileptique induit par le kaïnate (10 mg/kg, i.p.) chez des rats. Un traitement de sept jours par des statines (10 mg/kg, *per-os*) diminuait la sévérité des crises épileptiques ainsi que le nombre « d'ébrouements » induits par l'administration de kaïnate (Lee et al., 2008). En revanche, l'administration des statines 30 minutes après celle du kaïnate ne modifiait pas les crises épileptiques développées par les animaux. Une étude précédente rapportait les effets anticonvulsivants d'un traitement par un agoniste PPAR-gamma dans un modèle de crises audiogènes induites chez des souris déficientes en magnésium (Maurois et al., 2008). L'activation des récepteurs nucléaires PPAR-gamma par la FMOC-L-leucine (ED50 : 4,8 +/- 1,3 mg/kg, i.p.) une heure avant l'induction des crises épileptiques avait des propriétés anticonvulsivantes dans ce modèle de crises audiogènes. Les effets anticonvulsivants induits par la FMOC-L-leucine étaient diminués lors de l'administration d'un antagoniste PPAR-gamma (GW9662, 1 à 2 mg/kg). L'administration de rosiglitazone (> 100 mg/kg, i.p.), un autre agoniste PPAR-gamma, n'avait pas d'effet anticonvulsivant. Les effets anticonvulsivants de la FMOC-L-leucine (1 à 100 mg/kg) n'étaient pas retrouvés dans le modèle à 6 hertz.

Ces résultats sont en faveur d'une action anticonvulsivante portée par les agonistes des récepteurs PPARs. A ce jour, seul deux études ont rapporté une efficacité anticonvulsivante suite à des traitements par des agonistes des récepteurs PPAR-alpha. Ces résultats suggèrent qu'une activation des récepteurs PPAR-alpha puisse avoir un effet anticonvulsivant. Mais il reste à préciser si les propriétés anticonvulsivantes sont liées à une activation centrale et/ou périphérique des récepteurs PPAR-alpha. Ces résultats sont préliminaires, et des analyses complémentaires sont nécessaires notamment dans d'autres modèles de crises épileptiques, en utilisant des posologies de fénofibrate différentes et en évaluant différents agonistes de ces récepteurs.

III. Les AGPI, une alternative au régime cétogène

Dans notre travail, les apports journaliers en LA + ALA étaient identiques pour le régime cétogène et pour le mélange ALA/LA (respectivement 5,27 et 5,24 g/kg/jour). Mais les ratios LA/ALA étaient inversés (régime cétogène : LA/ALA = 1,7/0,1 ; mélange ALA/LA : LA/ALA = 2,5/7). Pour le mélange LCP, l'apport quotidien en ALA + LA était moins important par rapport aux deux traitements précédents (1,5 g/kg/jour), mais le ratio LA/ALA était comparable à celui du régime cétogène (LA/ALA = 1,2/0,2). Les différences observées au cours de l'évaluation des propriétés anticonvulsivantes pourraient être liées à la qualité, à la quantité et/ou aux ratios n-6/n-3 d'AGPI apportés.

1) Quantité d'AGPI

Des études précédentes décrivaient les effets anticonvulsivants du mélange SR-3. L'administration quotidienne (i.p.) d'un mélange SR-3 (LA/ALA de ratio 4/1) pendant 21 jours à la posologie de 40 mg/kg/jour avait un effet anticonvulsivant (Rabinovitz et al., 2004; Yehuda et al., 1994). Ces effets étaient retrouvés dans plusieurs modèles de crises épileptiques chez des rats [PTZ (50 ou 100 mg/kg, i.p.), irritation corticale par le FeCl₃, crises audiogènes]. Cependant, ce mélange (40 mg/kg/jour, i.p.) n'avait pas d'effet anticonvulsivant dans deux autres études (Taha et al., 2006; Taha et al., 2008a). Mais un effet dose-dépendant était rapporté (Taha et al., 2008a). Un traitement de 21 jours par le mélange SR-3 à la posologie de 200 mg/kg/jour induisait une augmentation du délai d'apparition des crises épileptiques induites par le PTZ (80 mg/kg, i.p.). Toutefois, les résultats obtenus avec le mélange SR-3 doivent être prudemment comparés aux nôtres étant donné que les voies d'administration, les posologies et la méthode d'évaluation utilisées sont différentes des nôtres.

Les propriétés anticonvulsivantes décrites pourraient être liées aux quantités ALA + LA apportées quotidiennement. En effet le mélange LCP apporte une quantité ALA + LA journalière de 1,5 g/kg alors que le régime cétogène et le mélange ALA/LA (qui possèdent des propriétés anticonvulsivantes) apportent des quantités journalières ALA + LA de l'ordre de 5,2 g/kg. Toutefois, l'apport d'EPA ou de DHA (6 g/kg/jour) pendant quatre semaines via l'alimentation se révélait inefficace chez des souris (Willis et al., 2008). La posologie utilisée est pourtant similaire à celle apportée dans notre étude par le régime cétogène ou par le mélange ALA/LA. Ces derniers résultats suggèrent que les propriétés anticonvulsivantes dépendraient aussi de la qualité des AGPI apportés. Ce dernier point est suggéré par l'absence d'effet anticonvulsivant du mélange LCP, de l'EPA ou du DHA, même lorsqu'ils sont

administrés à des posologies similaires à celles pour lesquelles nous avons observé des propriétés anticonvulsivantes.

Trois études cliniques ont également évalué les effets anticonvulsivants d'un apport entérale en AGPI chez des patients ayant une épilepsie pharmacorésistante. Dans ces études, les quantités d'AGPI utilisées étaient variables : 2,2 mg/jour d'EPA + DHA (Bromfield et al., 2008), 1,7 g/jour d'EPA + DHA (Yuen et al., 2005) ou 3,25 g/jour d'un mélange DHA + EPA + ALA (Schlanger et al., 2002). L'apport quotidien d'une quantité d'AGPI de l'ordre du mg/jour n'avait pas d'effet anticonvulsivant, tandis que l'apport de 1,7 g/jour ou de 3,25 g/jour avait une efficacité anticonvulsivante. L'efficacité décrite était transitoire pour l'étude utilisant 1,7 g/jour (6 semaines). Pour celle utilisant une quantité de 3,25 g/jour, une efficacité anticonvulsivante était retrouvée après six mois de traitement chez les 5/21 patients encore en traitement. La quantité d'AGPI apportée dans ces études cliniques semble très faible en comparaison avec la posologie efficace du mélange ALA/LA de notre étude. Les quantités d'AGPI utilisées dans ces études cliniques ne reflètent pas les apports en AGPI du régime cétogène chez l'Homme, qui sont de l'ordre de 3 à 4 g/kg/jour d'AGPI pour un enfant de 5 ans.

2) Qualité des AGPI

Suite aux précédentes observations sur la quantité d'AGPI apportée, il est logique de s'intéresser à la qualité des AGPI apportés, et à la corrélation entre qualité et propriétés anticonvulsivantes.

Ratios LA/ALA

Dans notre étude, seul le régime cétogène et le mélange ALA/LA possédaient des propriétés anticonvulsivantes. Ces résultats suggèrent que l'efficacité de ces apports n'est pas liée aux ratios LA/ALA, car dans ces deux traitements les ratios LA/ALA sont inverses. Le régime cétogène apporte principalement du LA (1,1/0,1) alors que le mélange ALA/LA contient principalement de l'ALA (2,5/7). Le mélange SR-3 possédait aussi des propriétés anticonvulsivantes pour un ratio LA/ALA de 4/1 (Rabinovitz et al., 2004;Taha et al., 2008a;Yehuda et al., 1994). En accord avec ces observations, le mélange LCP (1,2/0,2) utilisé dans notre étude n'avait pas d'effet anticonvulsivant alors que le ratio LA/ALA était comparable à celui du régime cétogène.

L'ensemble de ces résultats suggère que le ratio LA/ALA n'est pas déterminant dans l'apparition des propriétés anticonvulsivantes des AGPI. En revanche, l'efficacité anticonvulsivante d'un tel apport serait dépendant de la quantité d'ALA + LA apportée quotidiennement, suggérant la possibilité d'un effet-dose comme décrit précédemment (Taha et al., 2008a). Cette constatation nécessite d'être approfondie afin de préciser quelles sont les posologies optimales, et de déterminer à quelles doses ce traitement devient toxique pour les animaux. En effet, dans une étude précédente, l'administration du mélange SR-3 à de fortes posologies pendant 21 jours (400 ou 1000 mg/kg, i.p.) était décrit comme toxique pour les animaux (perte de poids, ballonnements, refus de s'alimenter). Les paramètres de cette toxicité nécessitent d'être clarifiés, mais les auteurs suggéraient qu'elle puisse être liée à la répétition des injections i.p., et à l'agression de la cavité gastro-intestinale par un tel traitement.

Rôles de l'ALA et du LA

Dans notre étude, les apports en AGPI se font sous forme de « mélange » contenant entre autre du LA et de l'ALA. Le mélange LCP est composé de LA et d'ALA, mais il contient aussi de l'AA, du DHA et de l'EPA. Dans notre étude, seul le régime cétogène et le mélange ALA/LA avaient des propriétés anticonvulsivantes. Ces résultats suggèrent que les propriétés anticonvulsivantes observées soient portées par le LA et/ou l'ALA. Cette hypothèse semble confirmée par le fait qu'une efficacité anticonvulsivante était retrouvée lors de l'administration du mélange SR-3 (LA/ALA) chez des rats (Rabinovitz et al., 2004;Taha et al., 2008a;Yehuda et al., 1994). Mais comme nous l'avons souligné dans la partie précédente, un parallèle entre ces études et la notre est difficile, du fait des différences de méthodologies. Finalement, l'apport entérale de DHA ou d'EPA n'induisait pas de propriétés anticonvulsivantes chez des souris, et ce dans plusieurs modèles de crises épileptiques [seuil au PTZ (i.v.), fluorothyl, kaïnate (35 mg/kg, i.p.), 6 hertz] (Willis et al., 2008).

A ce jour, aucune étude n'a évalué de façon isolée les effets anticonvulsivants de l'ALA et du LA. Ces deux acides gras sont toujours administrés sous forme de mélange. Il reste donc à déterminer si les propriétés anticonvulsivantes sont portées par l'un ou l'autre de ces deux AGPI, ou si elles sont liées au fait que ces deux AGPI sont administrés sous forme de mélange.

3) Mécanismes d'action des AGPI

Plusieurs hypothèses d'action ont été envisagées et explorées pour expliquer les propriétés anticonvulsivantes du mélange ALA/LA observées dans nos travaux. Parmi ces hypothèses, il y avait la modification du statut nutritionnel des animaux ou la modification des AGPI cérébraux et/ou plasmatiques.

Statut nutritionnel

Au cours de notre étude, les animaux ayant reçu une version normocalorique du régime cétogène ou les mélanges ALA/LA et LCP ne présentaient pas de modification du statut nutritionnel. Le poids des animaux augmentait de la même façon pour les animaux ayant reçu une alimentation à volonté (LINO, LCP et contrôle), et pour ceux ayant reçu une alimentation normocalorique (KD). L'analyse de la composition corporelle ne montrait pas de modification de la teneur en matière grasse corporelle quel que soit le traitement. Ces résultats suggèrent que l'efficacité anticonvulsivante n'est pas liée à une modification du statut nutritionnel.

Pourtant, des études rapportaient que les effets anticonvulsivants étaient liés à une restriction calorique (Eagles et al., 2003; Greene et al., 2001). Les effets anticonvulsivants de différentes restrictions alimentaires étaient comparés (Eagles et al., 2003). Les rats ayant reçu pendant 21 jours un régime riche en glucides, mais hypocalorique (10 %, 45 % et 50 % de restriction) présentaient une augmentation des seuils au PTZ (i.v.) comparable à l'augmentation observée pour les animaux ayant reçu un régime cétogène hypocalorique (10 % de restriction). De tels résultats étaient également retrouvés pour une version du régime standard où les calories étaient limitées à 90 % des besoins journaliers. Les effets anticonvulsivants d'une restriction alimentaire étaient aussi observés chez des souris EL mice. Une restriction calorique de 15 % ou 30 % des besoins caloriques journaliers (alimentation standard) retardait l'apparition des crises épileptiques de façon dose-dépendante (Greene et al., 2001). Dans ces deux études, les animaux recevant une restriction calorique présentaient une diminution significative du poids par rapport aux animaux témoins.

D'autres études utilisant des versions hypocaloriques du régime cétogène (10 % de restriction) et/ou une limitation dans le temps de l'accès à la nourriture (limitation à 2h30 / jour) rapportaient l'efficacité anticonvulsivante du régime cétogène dans plusieurs modèles de

crises épileptiques. Ces effets étaient retrouvés chez des rats dans les modèles de crises induites par le PTZ (i.v.), le PTZ (70 mg/kg, s.c.), le GBL (100 mg/kg, i.p.), la picrotoxine (1,89 mg/kg, s.c.) et la bicuculline [1,80 mg/kg, s.c.] (Bough et al., 1999b; Bough et al., 2000a; Bough et al., 2002; Bough and Eagles, 1999; Thavendiranathan et al., 2003), et chez la souris lors d'une évaluation dans un modèle de crises épileptiques induites par le fluorothyl ou dans le modèle 6 hertz (Rho et al., 1999; Samala et al., 2008). Mais ces études comportent un biais car elles ne font pas de comparaison entre l'efficacité anticonvulsivante des versions normocaloriques et hypocaloriques du régime cétogène. Seul une étude a évalué ce point (Raffo et al., 2008). Un traitement de 21 jours par une version normocalorique du régime cétogène était inefficace chez les rats, tandis que la version hypocalorique (15 % de restriction) avait des propriétés anticonvulsivantes (Raffo et al., 2008). L'évaluation des propriétés anticonvulsivantes était réalisée à l'aide d'un modèle de seuils au PTZ (i.v.) associé à des enregistrements EEG chez des rats adultes (P70 lors de l'évaluation). Les rats ayant reçu la version hypocalorique présentaient une augmentation des seuils pour la première absence, la première myoclonie et la crise clonique. Alors que le régime cétogène normocalorique était inefficace. Les animaux traités par les versions hypocaloriques et normocaloriques présentaient une diminution du poids corporel par rapport aux animaux témoins. Nos résultats ne sont pas en accord avec cette étude. Dans notre travail, nous avons inclus de jeunes rats (110 g) et des adultes (280-320 g), après respectivement 30 et 14 jours de traitement par une version normocalorique du régime cétogène, nous retrouvions un effet anticonvulsivant, tandis que Raffo et al. ne trouvaient pas cette efficacité pour des rats de 150-200 g à l'inclusion (Raffo et al., 2008). Notre étude et celle de Raffo et al. (Raffo et al., 2008) confirment toutefois qu'une modification du poids corporel n'est pas associée à l'efficacité anticonvulsivante.

Il faut aussi souligner que dans notre étude, le régime cétogène et les apports en AGPI ont été introduits sans jeûne préalable. Notre méthodologie pour l'introduction des compléments alimentaires est comparable aux méthodologies décrites précédemment (Rabinovitz et al., 2004; Taha et al., 2008a; Taha et al., 2006; Willis et al., 2008; Yehuda et al., 1994). En revanche, dans la majorité des études utilisant le régime cétogène, celui-ci était introduit après une période de jeûne allant de 6 heures à 12 heures (Bough et al., 1999b; Bough et al., 2000a; Bough et al., 2002; Bough and Eagles, 1999; Rho et al., 1999; Thavendiranathan et al., 2003). Dans notre étude, même sans jeûne préalable le régime cétogène était efficace après 14 et 30 jours de traitement. Nos résultats sont en adéquation avec les précédentes études cliniques qui rapportaient que l'absence de jeûne initial ne modifiait pas l'efficacité anticonvulsivante à long terme du régime cétogène (Bergqvist et al., 2005; Eun et al., 2006; Kim et al., 2004; Wirrell et al., 2002). Ces observations concernant le

régime cétoène sont en faveur d'une simplification des protocoles cliniques. En effet, la suppression du jeûne initial pourrait être un facteur améliorant la tolérance et l'acceptation du traitement par les patients et leurs familles.

Phospholipides cérébraux et AGPI

L'efficacité anticonvulsivante du mélange ALA/LA et du régime cétoène n'était pas associée à une modification de la composition en AGPI contenus dans les phospholipides cérébraux (PC et PE). Les animaux ayant reçu le mélange LCP ne présentaient pas de modification des AGPI contenus dans les phospholipides cérébraux, mais présentaient une diminution significative du ratio n-6/n-3 pour les fractions PC et PE. Cette variation du ratio n-6/n-3 pour les animaux traités par le mélange LCP semble davantage être le reflet de la composition complexe de ce mélange (AA, DHA, EPA, LA, ALA).

Une étude utilisant des souris fat-1 (qui transforment les AGPI n-6 en AGPI n-3) montrait une augmentation du DHA et une diminution de l'AA dans les fractions PC et PE cérébrales (Taha et al., 2008b). Les auteurs corrélaient l'augmentation de la teneur en DHA à l'augmentation du délai d'apparition du premier sursaut myoclonique induit par le PTZ (50 mg/kg, s.c.) avec un coefficient de linéarité $r = 0,56$. Mais les souris (témoins et fat-1) étaient nourries par un régime dépourvu en AGPI n-3. Les souris fat-1 transforment le LA contenu dans leur alimentation en AGPI n-3, mais les souris témoins sont incapables de faire cette transformation. Les résultats des dosages des AGPI contenus dans les phospholipides cérébraux après six semaines de régime montraient que les souris témoins étaient carencées en AGPI n-3 : faible taux de DHA dans les fractions PC (1,4 %) et PE (9 %) alors que les valeurs usuelles sont respectivement de l'ordre de 8 % et 20 % et augmentation du C22 :5 n-6 l'analogue de l'EPA dans la série des n-6. Cette carence en AGPI n-3 chez les souris témoins représente un biais dans cette étude puisque la différence entre les souris témoins et fat-1 repose justement sur la composition en AGPI n-3 dans les phospholipides cérébraux. La corrélation décrite chez les souris fat-1 est donc à prendre avec précaution.

L'administration quotidienne du mélange SR-3 (40 ou 200 mg/kg, i.p.) chez des rats ne modifiait pas la composition en AGPI contenus dans les phospholipides cérébraux (Taha et al., 2008a). Mais pour les rats traités par le mélange SR-3 (200 mg/kg), il était retrouvé une augmentation du contenu global en AGPI n-3 dans la fraction des acides gras totaux contenant les acides gras libres cérébraux. Cette augmentation était associée à des propriétés anticonvulsivantes (PTZ 80 mg/kg, i.p.). Cependant, les animaux traités par 40 ou 200 mg/kg de SR-3 présentaient un contenu non différent dans cette fraction, alors qu'ils ne présentaient

pas la même réponse suite à l'administration de PTZ. Cette étude suggère que les AGPI contenus dans la fraction des acides gras libres cérébraux pourraient être impliqués dans la modulation de l'excitabilité cérébrale. Une modification de la teneur en AGPI au niveau cérébral était rapportée dans deux autres études, suite à un traitement par plusieurs versions du régime cétogène (Dell et al., 2001;Taha et al., 2005). Mais ces travaux rapportaient uniquement l'analyse biochimique, les propriétés anticonvulsivantes des différents traitements n'étaient pas évaluées chez ces animaux.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Taha et coll. (Taha et al., 2008a), et ils suggèrent que les propriétés anticonvulsivantes portées par l'apport en ALA + LA ne sont pas liées à la modification des AGPI contenus dans les phospholipides cérébraux. Nos études respectives ne trouvaient pas de modification des AGPI contenus dans les phospholipides cérébraux après 21 et 30 jours de traitement par des AGPI ou par le régime cétogène. La cinétique d'incorporation des AGPI n-3 chez des rats carencés en n-3 a montré que l'incorporation totale du DHA se faisait en deux semaines dans le tissu plasmatique contre huit semaines au niveau cérébral (Moriguchi et al., 2001). Les changements alimentaires semblent avoir induit une modification des AGPI contenus dans les phospholipides plasmatiques, alors que ces changements n'ont pas encore eu lieu ou, ne sont pas encore observables au niveau cérébral. L'efficacité anticonvulsivante étant observée après 14 ou 30 jours de traitement par le régime cétogène, l'hypothèse d'une action anticonvulsivante via une modification de la composition en AGPI dans les phospholipides cérébraux semble écartée. Les résultats obtenus avec les souris fat-1 présentent des biais que nous avons détaillés précédemment (Taha et al., 2008b).

L'augmentation du contenu en AGPI n-3 dans la fraction des acides gras totaux contenant les acides gras libres mériterait d'être analysée plus en détail.

Modifications des AGPI contenus dans les phospholipides plasmatiques

Suite à l'apport entérale des mélanges ALA/LA et LCP, une augmentation de l'EPA et de l'ALA contenus dans les phospholipides plasmatiques était retrouvée. Les animaux recevant le régime cétogène ne présentaient pas de variations en ALA et en EPA dans les phospholipides plasmatiques. Une augmentation du DHA contenu dans les phospholipides plasmatiques était retrouvée uniquement chez les animaux ayant reçu le mélange LCP. Ces variations reflètent la composition en AGPI du régime cétogène et des deux mélanges. Le régime cétogène est pauvre en AGPI n-3, ce qui explique l'absence de modifications d'EPA, d'ALA et de DHA contenus dans les phospholipides plasmatiques. Tandis que le mélange LCP

apporte des AGPI n-3 en quantité dont du DHA. Chez les animaux traités par le régime cétogène ou recevant le mélange ALA/LA, une diminution de l'AA contenu dans les phospholipides plasmatiques était observée. Une telle variation n'était pas retrouvée chez les animaux recevant le mélange LCP, qui ne présentaient pas d'augmentation des seuils au PTZ.

Dans nos résultats cliniques, l'ensemble des patients traités par le régime cétogène ou par le régime modifié d'Atkins présentait une augmentation de LA + ALA contenus dans les acides gras totaux plasmatiques. Les autres AGPI ne variaient pas chez ces patients. Quand le profil des AGPI plasmatiques était analysé en fonction de l'efficacité du traitement, les patients qui répondaient aux traitements présentaient une diminution de l'AA contenu dans les acides gras totaux plasmatiques à un et trois mois de traitement. Une diminution du DHA contenu dans les acides gras totaux plasmatiques était aussi retrouvée après trois mois de traitement chez les patients qui répondaient au traitement. Les variations en AGPI contenus dans les phospholipides sériques ou dans les acides gras totaux sériques peuvent être le reflet des apports alimentaires (Dahlin et al., 2007; Kossoff and McGrogan, 2005), mais nous pouvons aussi envisager que la diminution de l'AA contenu dans les phospholipides ou dans les acides gras totaux plasmatiques puisse être corrélée à l'efficacité anticonvulsivante des traitements.

Rôle de l'acide arachidonique

Une diminution de l'AA contenu dans les phospholipides plasmatiques était observée chez les rats après un mois de traitement par le régime cétogène ou par le mélange ALA/LA. Cette diminution était également retrouvée après un et trois mois de traitement chez les patients qui répondaient au régime cétogène ou au régime modifié d'Atkins. Ces résultats suggèrent que la diminution de la concentration plasmatique en AA pourrait être impliquée dans l'efficacité anticonvulsivante que nous avons observée dans ces différents traitements. Toutefois, il n'y avait pas de corrélation linéaire entre l'efficacité du traitement et les variations de la concentration plasmatique en AA (fraction PC) $p = 0,085$.

Les variations en AGPI plasmatiques suite à différents apports alimentaires en AGPI ou suite au régime cétogène ont été analysées dans différentes études *in vivo*. Les résultats concernant les variations de l'AA sont contrastés. Une diminution de la concentration en AA contenu dans les acides gras estérifiés plasmatiques était rapportée chez des souris recevant 6 g/kg/jour d'EPA ou de DHA dans l'alimentation (Willis et al., 2008). Mais la diminution de l'AA plasmatique et l'apport alimentaire en DHA ou en EPA n'étaient pas corrélés à un effet anticonvulsivant. Une diminution de la concentration de l'AA dans la fraction des acides gras

libres plasmatiques était retrouvée suite à un traitement de 48 jours par un régime cétogène qui contenait 21 % de LA et 38 % d'ALA. Mais l'efficacité anticonvulsivante du traitement n'était pas évaluée de façon concomitante (Dell et al., 2001). Une autre étude rapportait une diminution de l'AA contenu dans les acides gras totaux plasmatiques suite à un traitement de 10 jours par le régime cétogène. Mais là aussi, les propriétés anticonvulsivantes du traitement n'étaient pas évaluées (Taha et al., 2005).

Dans les études cliniques, une diminution de l'AA plasmatique chez des patients traités par le régime cétogène a été rapportée. Une diminution de l'AA contenu dans les phospholipides plasmatiques était retrouvée après trois mois de traitement (n=21) mais cette diminution n'était pas corrélée à l'efficacité du régime cétogène (Dahlin et al., 2007). Il était rapporté une diminution de la concentration en AA contenu dans les phospholipides des érythrocytes (représentatif des PC plasmatiques) chez des patients (n=29) recevant un apport entérale d'AGPI n-3 EPA / DHA (10/7). Dans cette étude, seul 5/29 patients présentaient une amélioration de la fréquence des crises épileptiques supérieure à 50 %. Mais les concentrations en AA plasmatique (contenu dans les PC des érythrocytes) de ces cinq patients n'étaient pas analysées séparément (Yuen et al., 2005). Seul une étude menée chez 9 patients présentait des résultats opposés (Fraser et al., 2003). Les patients qui présentaient une diminution de la fréquence des crises épileptiques présentaient une augmentation de la concentration plasmatique en AA contenu dans les acides gras libres, mais aussi dans les phospholipides et les triglycérides.

Les études *in vitro* peuvent éclairer le fait qu'une diminution de l'AA puisse avoir une efficacité anticonvulsivante. L'application d'AA sur des neurones conduisait à augmenter l'excitabilité cellulaire (Keros and McBain, 1997; Poling et al., 1996). De même, l'application d'AA sur des neurones induisait une inhibition des courants potassiques transitoires ou activés par une dépolarisation. De tels effets étaient retrouvés pour les neurones pyramidaux de la région CA1 et pour les interneurones inhibiteurs du *stratum oriens-alveus*.

L'AA peut également moduler l'inflammation. Plusieurs études décrivaient que la réaction inflammatoire et surtout la présence de certaines cytokines (TNF-alpha, IL1-bêta, IL6) favorisaient la survenue des crises épileptiques chez les rongeurs (Sayyah et al., 2003; Vezzani et al., 2002; Yuhas et al., 1999). Ces molécules pro-inflammatoires étaient mêmes décrites comme étant pro-convulsivantes (Auvin and Sankar, 2008; Vezzani and Granata, 2005). L'AA (libre ou libéré par la dégradation des phospholipides) peut être oxydé par la voie des COX ou des LOX. Cette oxydation conduit à la libération d'eicosanoïdes telles que les leucotriènes de la série 4 ou les prostaglandines de la série 2 qui sont des molécules

pro-inflammatoires (Calder, 2005). La libération de ces molécules pourrait donc favoriser la survenue des crises épileptiques. L'administration d'inhibiteurs sélectifs (nimesulide, rofecoxib, celecoxib) ou non sélectifs (aspirine, naproxen) de COX-2 avait des effets anticonvulsivants chez des rats et des souris (Akula et al., 2008;Dhir et al., 2006a;Dhir et al., 2006b;Kelley et al., 1999;Kim and Jang, 2006;Oliveira et al., 2008). Ces effets anticonvulsivants étaient décrits dans plusieurs modèles de crises épileptiques [PTZ (i.v.), PTZ (i.p.), bicuculline, picrotoxine, fluorothyl, kaïnate]. Nous détaillerons ce point dans la partie suivante.

Ainsi ces résultats suggèrent qu'une diminution de la quantité et/ou de la disponibilité de l'AA plasmatique pourrait contribuer à diminuer la survenue des crises épileptiques via une diminution de la production et/ou de la libération de molécules pro-inflammatoires. Il est aussi à noter qu'une diminution de l'AA (n-6) peut être compensée par une augmentation des AGPI à 20 et 22 carbones de la série n-3 (EPA et DHA) dont les dérivés eicosanoïdes et docosanoïdes ont une faible activité inflammatoire (Calder, 2005).

IV. Mode d'action du fénofibrate

Le fénofibrate possède des propriétés anticonvulsivantes. Le fénofibrate traverse lentement la barrière hémato-encéphalique (Deplanque et al., 2003). Dans un modèle cellulaire de barrière hémato-encéphalique, le coefficient de perméabilité pour le fénofibrate est de $0,68 * 10^{-3}$ cm/min alors que pour le sucrose il est de $0,70 * 10^{-3}$ cm/min. Un traitement de 14 jours par le fénofibrate pourrait permettre sa diffusion à travers la barrière hémato-encéphalique et dans le cerveau. Mais cet aspect n'a pas été vérifié dans ce travail. Nous devons donc envisager que l'action anticonvulsivante du fénofibrate puisse être liée à une action périphérique et/ou centrale de celui-ci. L'action anticonvulsivante du fénofibrate pourrait se faire par des mécanismes PPAR-alpha dépendants : modulation de l'inflammation et de l'expression de gènes impliqués notamment dans le métabolisme énergétique.

1) Modulation de l'inflammation par les récepteurs PPAR-alpha

L'activation du récepteur PPAR-alpha par ses agonistes synthétiques (fibrates, statines..) ou naturels (DHA, EPA, ALA, LA) peut conduire à une modulation des marqueurs de l'inflammation. Des patients traités un mois par le fénofibrate présentaient une diminution des concentrations plasmatiques en TNF-alpha et en interféron-gamma (Madej et al., 1998)

tandis que des souris déficientes en récepteur PPAR-alpha présentaient une réaction inflammatoire exacerbée suite à l'administration de LTB4 (Devchand et al., 1996). Ces modulations semblent liées à l'action du récepteur PPAR-alpha activé sur la formation des complexes NFkB et AP-1 qui régulent l'expression de nombreux gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-alpha, l'IL1 et l'IL6 (Delerive et al., 1999).

Il était rapporté que l'action anticonvulsivante d'un agoniste PPAR-alpha était associée à une diminution de l'inflammation dans l'hippocampe (Lee et al., 2008). Des rats recevant un traitement de sept jours par des statines présentaient une diminution de la sévérité des crises épileptiques induites par le kaïnate. En plus de cette action anticonvulsivante, les animaux présentaient une diminution de l'infiltration des macrophages et des monocytes dans l'hippocampe, ainsi qu'une diminution des ARNm du TNF-alpha, de l'IL1-bêta et de la NO synthase inductible (iNOS). Des cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL1-bêta et le TNF-alpha avaient une action pro-convulsivante chez les rongeurs. Des souris inoculées par un broyat de *Shigella* présentaient une augmentation de la sévérité des crises épileptiques induites par du PTZ (50 mg/kg, i.p.) 7 et 24 heures après l'infection (Yuhass et al., 1999). Quand les souris recevaient une injection (i.v.) d'anti-TNF-alpha ou d'anti-IL1-bêta 30 minutes avant l'infection par *Shigella*, l'augmentation de la sévérité des crises induites par le PTZ était abolie. Des résultats similaires étaient retrouvés chez des souris qui recevaient du lipopolysaccharide d'*E.coli* (LPS, 1 mg/kg, i.p.) 1 et 8 heures avant la réalisation d'un seuil au PTZ (i.v.). Les souris recevant le LPS présentaient une diminution des seuils au PTZ. Lorsque les auteurs administraient des inhibiteurs de la NO synthase, de la COX et des récepteurs aux opioïdes les effets pro-convulsivants du LPS étaient abolis (Sayyah et al., 2003). Chez des rats, l'administration de kaïnate dans l'hippocampe induisait des crises épileptiques et conduisait à une augmentation de l'expression du TNF-alpha (264 %), de l'IL1-bêta (445 %) et de l'IL6 (405 %) ainsi qu'à l'activation de la microglie (Vezzani et al., 2002). Toujours dans cette étude, lorsque de l'IL1-bêta (1 ng/ 0,5 µL) était administrée dans l'hippocampe 10 minutes avant le kaïnate (0,2 nmol/µL), la durée des crises induites par le kaïnate était augmentée. En revanche, quand un antagoniste du récepteur à l'IL1-bêta était administré (0,1 µg, i.c.v.) la durée et le nombre de crises épileptiques étaient diminués. Finalement, il était rapporté que des souris immatures (14 jours) et déficientes en récepteur à l'IL1-bêta (IL1-Ra) présentaient une augmentation du seuil (température) pour l'apparition des crises hyperthermiques (Dube et al., 2005). Quand les souris sauvages recevaient une injection (5 ng, i.c.v.) d'IL1-bêta, les seuils pour l'apparition des crises hyperthermiques (températures) étaient diminués par rapport aux animaux témoins. L'injection d'IL1-bêta n'avait aucun effet chez les souris déficientes en IL1-Ra. L'inhibition du facteur NFkB et des voies inflammatoires associées, par le récepteur PPAR-alpha activé, pourrait avoir un effet anticonvulsivant via

l'inhibition de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, qui sont également pro-convulsivantes.

Les récepteurs PPAR-alpha activés peuvent aussi réguler l'expression de COX-2. L'enzyme COX-2 est inductible et elle catalyse la transformation de l'AA en eicosanoïdes, qui sont également des activateurs de PPAR-alpha (Grau et al., 2008;Kliewer et al., 1997;Morales et al., 2006). La régulation de l'expression de COX-2 se ferait via l'inhibition de la formation du complexe NFkB (Yu et al., 2006). Ces propriétés sont en faveur d'une action anticonvulsivante. Il était rapporté que l'administration d'un inhibiteur sélectif de COX-2 (celecoxib, 2 mg/kg, *per-os*) 60 minutes avant l'administration de PTZ (60 mg/kg, *i.p.*) induisait une résistance à l'apparition des crises épileptiques chez des rats adultes [augmentation de la latence d'apparition de la première crise clonique et de la crise généralisée et diminution de la durée des convulsions] (Oliveira et al., 2008). Ces effets étaient également retrouvés quand les auteurs administraient des anticorps anti-PGE2 (4 µg/ 2 µL, *i.c.v.*). Toujours dans cette même étude, les rats qui recevaient une injection *i.c.v.* de PGE2 et une dose infra-convulsivante de PTZ (20 mg/kg, *i.p.*) présentaient une modification transitoire des tracés EEG pendant 10 minutes (apparition de pointes ondes). Les effets anticonvulsivants de l'inhibiteur sélectif de COX-2 étaient abolis par l'administration de PGE2 (10 ng/ 2 µL, *i.c.v.*). L'action pro-convulsivante de COX-2 était rapportée dans d'autres travaux (Akula et al., 2008;Dhir et al., 2006a;Dhir et al., 2006b;Kelley et al., 1999;Kim and Jang, 2006). L'administration d'inhibiteurs non sélectifs de COX-2 (aspirine [10 et 20 mg/kg, *per-os*], naproxen [7 et 14 mg/kg, *per-os*]) ou sélectifs (rofecoxib [1-4 mg/kg, *per-os*], nimesulide [1-5 mg/kg, *per-os*]) 45 minutes avant l'induction des crises épileptiques par le PTZ (80 mg/kg, *i.p.*) augmentait le délai d'apparition des crises cloniques, et diminuait leurs durées chez des souris (Dhir et al., 2006a). Les effets étaient plus marqués pour les inhibiteurs sélectifs de COX-2, et ces effets étaient dose-dépendant. L'administration des inhibiteurs sélectifs de COX-2 potentialisait également les effets d'une dose infra-convulsivante de diazépam (0,1 mg/kg, *i.p.*), et les seuils au PTZ étaient augmentés. De tels résultats étaient aussi rapportés dans un modèle de seuils au PTZ (*i.v.*) chez le rat (Akula et al., 2008). L'administration d'un inhibiteur sélectif de COX-2 (rofecoxib 2 ou 4 mg/kg, *i.p.*) 45 minutes avant la perfusion de PTZ induisait une augmentation des seuils pour l'apparition du premier sursaut myoclonique, de l'extension tonique et de la crise généralisée clonique (uniquement pour la plus forte dose de rofecoxib). Les effets anticonvulsivants du rofecoxib (2 mg/kg, *i.p.*) et du nimesulide (2,5 mg/kg, *i.p.*) étaient aussi retrouvés chez des souris, dans des modèles de crises épileptiques induites par la bicuculline (4 mg/kg, *i.p.*) et la picrotoxine [8 mg/kg, *i.p.*] (Dhir et al., 2006b). L'administration de ces inhibiteurs 45 minutes avant l'évaluation augmentait le délai d'apparition des crises cloniques, diminuait leurs durées et augmentait la survie des souris. Ces effets n'étaient pas retrouvés

dans un modèle de crises épileptiques induites par un choc électrique unique. Des effets anticonvulsivants du celecoxib étaient aussi retrouvés dans un modèle de crises épileptiques récurrentes induites par le fluorothyl chez des rats nouveaux-nés (7 à 10 jours de vie). L'administration répétée de fluorothyl (25 fois) induisait une augmentation de l'expression de COX-2 dans l'aire CA3, sans modification de l'expression des enzymes de synthèse des PGE2 (Kim and Jang, 2006). Lorsqu'un inhibiteur sélectif de la COX-2 (celecoxib, 10 ou 20 mg/kg, i.p.) était administré une heure avant le fluorothyl, le délai d'apparition des crises était significativement augmenté. Finalement, des souris transgéniques qui surexprimaient la COX-2 humaine au niveau neuronal, présentaient une augmentation de l'intensité des crises épileptiques induites par le kaïnate (1,25 nmoles, i.c.v.). Toutes les souris transgéniques mouraient à la suite de l'état de mal épileptique, tandis que les souris de phénotype sauvage survivaient (Kelley et al., 1999). Ainsi la régulation de l'expression de COX-2 par les récepteurs PPAR-alpha pourrait avoir une action anticonvulsivante.

L'ensemble de ces données suggère que l'action anticonvulsivante du fénofibrate pourrait être liée à une modulation des voies inflammatoires par le récepteur PPAR-alpha activé.

2) Modulation du métabolisme énergétique par les récepteurs PPAR-alpha

L'activation des récepteurs PPAR-alpha module le métabolisme des acides aminés (Kersten et al., 2001; Sheikh et al., 2007). Ces changements de quantité et/ou de disponibilité des acides aminés pourraient porter les propriétés anticonvulsivantes du fénofibrate. Ce mécanisme d'action est également envisagé comme hypothèse d'action du régime cétogène (Melo et al., 2006; Yudkoff et al., 2001; Yudkoff et al., 1997; Yudkoff et al., 2005). Il était rapporté que l'activation des récepteurs PPAR-alpha par un agoniste synthétique (WY14643) inhibait le catabolisme des acides aminés ainsi que les enzymes impliquées dans cycle de l'urée (Kersten et al., 2001; Sheikh et al., 2007). Le dosage plasmatique des acides aminés par spectrométrie (NMR) chez des rats (300 g) était réalisé 36 jours après le début d'un régime riche en lipides saturés (Sheikh et al., 2007). Les rats traités par un agoniste des récepteurs PPAR-alpha présentaient une augmentation des acides aminés plasmatiques suivants : thréonine, glutamine, lysine, taurine, tryptophane, ornithine, tyrosine, phénylalanine, serine et histidine et une diminution de la quantité d'arginine. Il était également observé une modulation de l'expression d'enzymes hépatiques liées à la transamination et à la déamination. L'ensemble de ces données suggère que l'activation des récepteurs PPAR-alpha module le métabolisme des acides aminés. Les données actuelles à ce sujet sont peu

nombreuses et aucune étude n'a évalué ces changements via l'activation de PPAR-alpha au niveau cérébral. Mais il est possible d'envisager que l'activation des récepteurs PPAR-alpha puisse conduire à moduler les quantités et/ou la disponibilité de certains acides aminés comme le glutamate, l'aspartate ou encore le GABA qui sont aussi les principaux neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs au niveau central.

Les récepteurs PPAR-alpha activés régulent l'expression d'enzymes mitochondriales impliquées dans l'oxydation des acides gras, et dans la cétogenèse comme la 3-hydroxyl-3-methylglutaryl-CoA (mHS). Cette enzyme est une enzyme clé de la cétogenèse puisqu'elle initie la formation des corps cétoniques. Un traitement *per-os* de 3 jours par du ciprofibrate (un agoniste des récepteurs PPAR-alpha) chez des rats (30-40 g) induisait une augmentation de 3,3 fois des ARNm de la mHS au niveau hépatique et une augmentation de 4,8 fois au niveau cérébral (Cullingford et al., 2002a). Les auteurs retrouvaient aussi une augmentation des ARNm codant pour ACOX (acyl-CoA dehydrogenase) et pour MCAD (medium chain acyl-CoA dehydrogenase) dans le foie et le cerveau. La régulation de l'expression de ACOX et MCAD est dépendante de PPAR-alpha. Une augmentation de l'expression de mHS au niveau hépatique et cérébral était aussi retrouvée quand les rats étaient traités 20 jours par un régime cétogène ou par une restriction calorique (alimentation normale) de 10 % (Cullingford et al., 2002b). Ces résultats sont en faveur d'une augmentation de la production des corps cétoniques au niveau périphérique et central. Les précédentes études menées avec le régime cétogène rapportaient l'absence de corrélation entre le degré de cétose (mesure du BHB plasmatique) et les propriétés anticonvulsivantes (Bough et al., 2000b;Harney et al., 2002;Hartman et al., 2008;Likhodii et al., 2000;Raffo et al., 2008;Thavendiranathan et al., 2000). Mais ces mesures n'évaluaient pas le degré de cétose au niveau cérébral. Le transport des corps cétoniques du sang vers le cerveau est proportionnel à la concentration de corps cétoniques dans le sang (Nehlig, 2004;Nehlig, 1999). Mais au niveau cérébral, une synthèse endogène de corps cétoniques peut avoir lieu. Par exemple, des astrocytes en culture étaient capables de synthétiser des corps cétoniques à partir de la leucine (Bixel and Hamprecht, 1995). Cette production locale de corps cétoniques pourrait contribuer à moduler l'excitabilité cellulaire. Une étude *in vitro* rapportait que l'application de BHB ou d'ACA (2 μ M) sur tranches ou sur des neurones isolés modulait l'activité des neurones GABA de la région substantia nigra pars reticulata en diminuant de 10 % les trains de potentiels d'action (Ma et al., 2007). L'augmentation de la concentration en corps cétoniques dans le cerveau pourrait également contribuer à modifier le métabolisme des acides aminés. Après un traitement de 21 jours par le régime cétogène, le métabolisme cérébral des rats changeait. Le glucose (marqué au carbone 13) qui était injecté était peu utilisé par les neurones tandis que les astrocytes utilisaient l'acétate (marqué au carbone 13) afin de produire les acides aminés tels que le

glutamate et le GABA (Melo et al., 2006). Cette production d'acides aminés par les astrocytes compensait la diminution de la production à partir du glucose par les neurones. De tels changements de métabolisme étaient également décrits chez le jeune rat allaité qui est un modèle naturel de cétose. Les animaux utilisaient les corps cétoniques pour assurer la synthèse des acides aminés et des lipides (Nehlig, 1999;Nehlig, 2004). L'activation du récepteur PPAR-alpha pourrait conduire à une modulation du métabolisme énergétique via une augmentation de la production des corps cétoniques au niveau cérébral et périphérique. Ces changements pourraient contribuer à une modification de l'excitabilité cérébrale et donc, à l'établissement de propriétés anticonvulsivantes.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'action anticonvulsivante du fénofibrate pourrait être PPAR-alpha dépendante. Elle pourrait se faire via une modulation de l'inflammation, une modulation du métabolisme des acides aminés et/ou une régulation de la cétogenèse. Mais dans notre étude aucune mesure ne permet de le confirmer. Nous n'excluons pas la possibilité que l'action du fénofibrate puisse aussi être indépendante de l'activation des récepteurs PPAR-alpha. Mais au-delà de l'action anticonvulsivante du fénofibrate, il est aussi possible d'envisager que les actions anticonvulsivantes du régime cétogène et/ou des AGPI décrites précédemment puissent s'exercer via l'activation du récepteur PPAR-alpha puisque les AGPI sont des agonistes naturels de ces récepteurs.

Chapitre VI : perspectives

PERSPECTIVES

Dans cette étude, nous avons montré que chez des rats l'administration quotidienne d'un mélange ALA/LA avait des effets anticonvulsivants comparables à ceux induits par le régime cétogène. Nos résultats suggèrent que le ratio LA/ALA n'est pas déterminant pour assurer cette action anticonvulsivante. En revanche, la quantité journalière d'AGPI apportés, ainsi que la qualité des AGPI apportés semblent avoir un rôle déterminant. Nos résultats montrent également que le pouvoir anticonvulsivant du mélange ALA/LA et du régime cétogène n'est pas lié à une modification des AGPI contenus dans les phospholipides cérébraux. En revanche nos résultats soulèvent une possible implication de la diminution de l'AA contenu dans les phospholipides plasmatiques. Cette diminution était retrouvée chez les rats traités par le régime cétogène et recevant le mélange ALA/LA. Mais elle était aussi retrouvée chez les patients qui répondaient au régime cétogène ou au régime modifié d'Atkins. Ces derniers résultats suggèrent que les propriétés anticonvulsivantes de ces traitements puissent être liées à la diminution de l'AA plasmatique. En complément de ces évaluations, nous avons également montré qu'un traitement de 14 jours par un agoniste PPAR-alpha avait des propriétés anticonvulsivantes chez le rat. Ces résultats suggèrent que le récepteur nucléaire PPAR-alpha pourrait être impliqué dans l'établissement des propriétés anticonvulsivantes.

Pour la suite, nos objectifs sont :

- (1) de déterminer si les propriétés anticonvulsivantes observées dans le cadre de notre étude sont liées à l'activation des récepteurs PPAR-alpha
- (2) de préciser quelles sont les caractéristiques pour que l'apport d'AGPI, via l'alimentation, ait des propriétés anticonvulsivantes
- (3) de définir si l'activation des récepteurs PPAR-alpha par le fénofibrate et/ou l'apport en AGPI contribuent à moduler les voies pro-inflammatoires
- (4) d'évaluer les effets de l'apport d'AGPI dans une étude clinique, chez des patients présentant une épilepsie pharmacorésistante

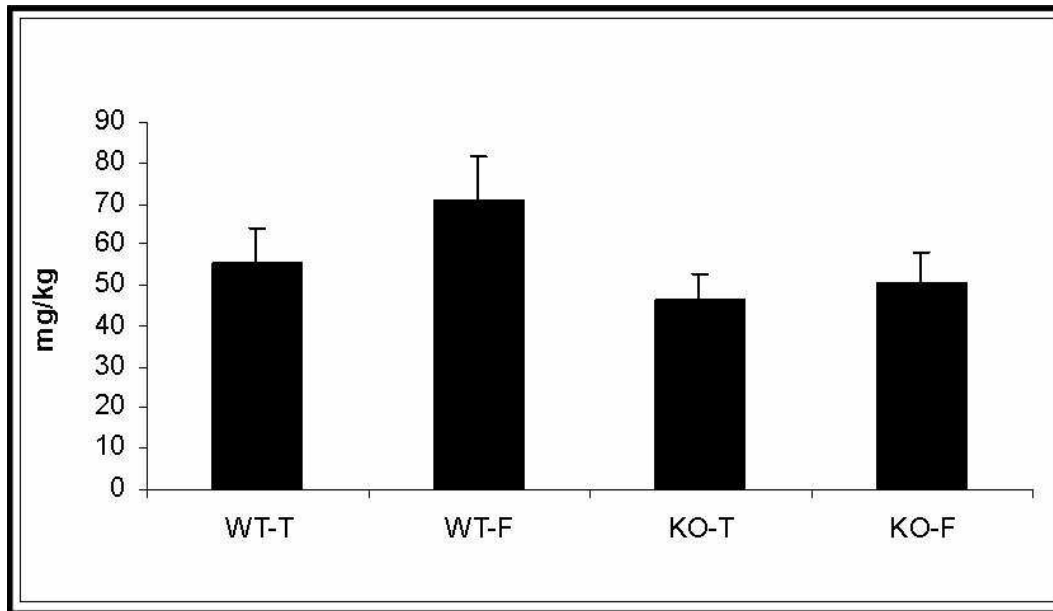
I. Le récepteur PPAR-alpha au cœur du mécanisme anticonvulsivant ?

Les résultats que nous avons obtenus avec le fénofibrate sont préliminaires. Ces résultats suggèrent l'implication du récepteur PPAR-alpha dans l'établissement des propriétés anticonvulsivantes, mais nous ne l'avons pas démontré au cours de ce travail.

Afin de compléter nos premières observations, une exploration de l'effet-dose du fénofibrate devrait être réalisée. Les résultats obtenus lors d'un traitement combinant le fénofibrate et le régime cétogène (groupe KDF) méritent d'être approfondis. Cette association thérapeutique induisait une augmentation des seuils au PTZ non significative mais avec une valeur de p proche de la significativité ($p \leq 0,08$). Nous avons envisagé que cette association thérapeutique puisse être toxique pour les rats, car à la fin de l'étude les animaux ayant reçu le traitement par le régime cétogène et le fénofibrate étaient moins bien portants que les rats ayant reçu le régime cétogène ou le fénofibrate (poids diminués et pelage d'aspect terne). Une évaluation de différentes posologies de fénofibrate en association avec un régime cétogène de même ratio ou de ratio inférieur pourrait être envisagée afin de compléter ces données.

Comme nous l'avons décrit dans cette étude, le fénofibrate et les AGPI sont des agonistes des récepteurs PPAR-alpha. Les propriétés anticonvulsivantes portées par les AGPI et le fénofibrate pourraient être liées à l'activation des récepteurs PPAR-alpha. Mais cela reste à démontrer. Les résultats d'une étude récente menée chez des rats sont en faveur de cette hypothèse. En effet, un traitement de sept jours par des statines avait des propriétés anticonvulsivantes dans un modèle d'état de mal épileptique induit par le kaïnate (Lee et al., 2008). En tenant compte de ces résultats, nous avons évalué les effets anticonvulsivants d'un traitement de 14 jours par le fénofibrate chez des souris C57bl6 de phénotype sauvage (WT) ou chez des souris C57bl6 déficientes en récepteur PPAR-alpha (KO) [fournies gracieusement par le Professeur Bart Staels, Institut Pasteur de Lille, U545]. L'évaluation des propriétés anticonvulsivantes était réalisée par un seuil au PTZ (i.v.), après 14 jours de traitement par une alimentation standard contenant 0,2 % de fénofibrate (WT-F [n=9] et KO-F [n=9]) ou après 14 jours d'une alimentation standard (WT-T [n=10] et KO-T [n=12]). Les résultats sont présentés dans la figure 27.

Figure 27 : Seuils au pentylènetétrazole (i.v.) pour la crise d'épilepsie généralisée chez des souris C57bl6 de phénotype sauvage recevant une alimentation standard (WT-T [n=10]) ou contenant 0,2 % de fénofibrate (WT-F [n=9]) et chez des souris déficientes en récepteur PPAR-alpha recevant une alimentation standard (KO-T [n=12]) ou contenant 0,2 % de fénofibrate (KO-F [n=9]). Les résultats sont des moyennes +/- esm, exprimés en mg/kg.



Les souris de phénotype sauvage traitées par le fénofibrate (WT-F) présentaient une tendance à l'augmentation des seuils au PTZ ($p = 0,07$) par rapport aux souris WT-T. Cette tendance était également retrouvée entre les souris WT-F et KO-F ($p=0,07$). Les souris KO-T et KO-F ne présentaient pas de différence avec les souris WT-T (respectivement $p = 0,58$ et $p = 0,9$). Les souris KO traitées par le fénofibrate ou recevant un régime standard présentaient des seuils au PTZ comparables ($p = 0,27$). Ces résultats préliminaires suggèrent que l'absence de récepteur PPAR-alpha n'a pas d'influence sur le seuil d'apparition des crises épileptiques. Pourtant, il a été précédemment décrit que les souris KO-PPAR-alpha présentaient une réaction inflammatoire exacerbée (Devchand et al., 1996). Le fénofibrate semble avoir un effet anticonvulsivant chez les souris de phénotype sauvage, mais cela reste à confirmer par des études complémentaires car la significativité n'est pas obtenue. Cet effet n'est pas retrouvé chez les souris KO traitées par le fénofibrate, ce qui suggère une implication des récepteurs PPAR-alpha dans cette action modulatrice.

Nous avons vu précédemment, que pour le régime cétogène l'évaluation des propriétés anticonvulsivantes chez les souris dépendait fortement des lignées de souris, et des modèles de crises épileptiques utilisés. La lignée C57bl6 a été utilisée dans une étude

précédente pour évaluer les propriétés anticonvulsivantes du régime cétoène, mais dans un modèle de décharge électrique unique (Martillotti et al., 2006). Nous ne savons donc pas si une évaluation par un seuil au PTZ chez des souris de cette lignée est un bon moyen d'évaluation des propriétés anticonvulsivantes. Une autre évaluation devrait être envisagée chez des souris déficientes en récepteur PPAR-alpha d'une autre lignée comme les SV129. En complément, cette évaluation devrait être menée dans des modèles de crises épileptiques autres que le modèle au PTZ (modèle 6 hertz, fluorothyl, kaïnate..).

II. Caractérisation des apports en AGPI

En ce qui concerne les AGPI, nous avons vu que chez les rats, les propriétés anticonvulsivantes semblent liées à l'apport d'ALA (n-3) et de LA (n-6). Afin de confirmer les effets anticonvulsivants observés, une évaluation de l'efficacité anticonvulsivante de l'administration du mélange ALA/LA devrait être évaluée dans d'autres modèles de crises épileptiques chez le rat et la souris (état de mal épileptique kaïnate et/ou lithium-pilocarpine, maximal electroshock....). Si ces résultats étaient confirmés chez la souris, les effets anticonvulsivants du mélange ALA/LA pourraient être évalués chez des souris déficientes en récepteurs PPAR-alpha afin de confirmer ou d'infirmer l'implication du récepteur PPAR-alpha dans les mécanismes conduisant à l'apparition de propriétés anticonvulsivantes.

Comme nous l'avons aussi souligné précédemment, le LA et l'ALA sont administrés sous forme de mélange au cours de traitements chroniques : mélange ALA/LA et mélange SR-3. Il est donc impossible de définir si les propriétés anticonvulsivantes sont liées à l'apport de ces deux AGPI ou, si elles sont portées uniquement par l'un des deux AGPI. Il serait donc intéressant d'analyser les propriétés anticonvulsivantes du LA et de l'ALA séparément afin de comparer les effets obtenus avec les propriétés anticonvulsivantes du mélange ALA/LA. De même que les posologies efficaces, optimales et toxiques n'ont pas été décrites. Dans notre étude, pour le mélange ALA/LA nous avons choisi la posologie de 6 g/kg/jour (contenant 5,2 g d'ALA + LA) car cette posologie est comparable aux apports en AGPI par le régime cétoène. Mais nous ne savons pas si cette posologie est la dose optimale. Une étude précédente décrivait l'effet toxique de l'administration du mélange SR-3 (i.p.) aux posologies de 400 et 1000 mg/kg chez des rats (Taha et al., 2008a). Les auteurs suggéraient que la toxicité puisse être liée à la répétition des injections i.p., mais elle n'était pas plus caractérisée.

En ce qui concerne les mécanismes d'action des AGPI, nous avons fait l'hypothèse qu'ils pourraient agir via l'activation des récepteurs PPAR-alpha. Mais nous avons également vu que les propriétés anticonvulsivantes étaient associées à une diminution de l'AA contenu dans les phospholipides plasmatiques. En faveur de cet argument, une diminution de la concentration en AA plasmatique était aussi retrouvée chez les patients qui répondaient au régime cétogène ou au régime modifié d'Atkins après un et trois mois de traitement. Ces observations restent à préciser, et la corrélation entre la diminution de l'AA au niveau plasmatique et les propriétés anticonvulsivantes du régime cétogène et du mélange ALA/LA reste à prouver. Pour cela, il serait intéressant d'évaluer les effets de l'administration d'un mélange ne contenant pas de précurseur de l'AA, ni d'AA. Comme il a été décrit que l'apport unique d'EPA ou de DHA n'avait pas de propriétés anticonvulsivantes chez des souris (Willis et al., 2008), il faudrait envisager d'utiliser un mélange de plusieurs AGPI n-3 (ALA/EPA/DHA). Ce mélange pourrait être administré pendant 14 et 28 jours de façon à réaliser une cinétique de l'apparition des propriétés anticonvulsivantes et de réaliser les dosages en AGPI plasmatiques à différents temps. L'évaluation des effets anticonvulsivants d'un régime cétogène dépourvu en AGPI n-6 mériterait également d'être explorée afin de préciser le rôle de l'AA.

III. Modulation de l'inflammation par les AGPI et les récepteurs PPAR-alpha

Il a été décrit que les molécules pro-inflammatoires (IL1, IL6, TNF-alpha) avaient une action pro-convulsivante (Auvin and Sankar, 2008; Vezzani and Granata, 2005). L'activation des récepteurs PPAR-alpha diminue l'expression de ces molécules via une inhibition de la formation des complexes NFkB et AP-1 (Delerive et al., 1999). Il serait donc intéressant de tester cette hypothèse chez les animaux traités par les fibrates (agoniste synthétique de PPAR-alpha) et chez les animaux traités par régime cétogène ou recevant le mélange ALA/LA. Pour cela, nous pourrions évaluer l'expression de marqueurs de l'inflammation (IL1-bêta, TNF-alpha) suite à un seuil au PTZ ou suite à un état de mal épileptique, où l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires est bien caractérisée (Vezzani et al., 2002). Cette évaluation pourrait être réalisée chez des animaux traités par régime cétogène, fénofibrate ou recevant des AGPI via l'alimentation. Ces évaluations pourraient également être réalisées suite à un traitement par un antagoniste du récepteur PPAR-alpha, ou chez des souris KO-PPAR-alpha.

La seconde observation en faveur de cette hypothèse est que les animaux traités par régime cétogène ou recevant le mélange ALA/LA présentaient une augmentation des AGPI n-3 dans le plasma, et une diminution de l'AA. Ces deux éléments pourraient contribuer à diminuer l'inflammation chez ces animaux. L'oxydation des AGPI n-3 par les COX et les LOX conduit à la libération de composés eicosanoïdes (LTB5 et PGE3) et docosanoïdes. Ces composés ont un faible pouvoir inflammatoire en comparaison à ceux issus de la dégradation de l'AA (LTB4 et PGE2).

Annexes : autres publications

(1) Acides gras poly-insaturés : propriétés et mécanismes anticonvulsivants

Natacha Porta, Stéphane Auvin

Médecine et Sciences, 2008 in press

(2) Le régime cétogène et ses variants : certitudes et doutes

Natacha Porta, Louis Vallée, Elisabeth Boutry, Stéphane Auvin

Revue Neurologique française, accepté sous réserve de modifications

(3) Prolonged ketogenic diet induces stroke protection in mice

Natacha Porta, Stéphane Auvin, Cécile Lecointe, Maud Laprais-Pétrault, Louis Vallée
and Régis Bordet

Journal of Neural Transmission, soumis

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Ahmed,W., Ziouzenkova,O., Brown,J., Devchand,P., Francis,S., Kadakia,M., Kanda,T., Orasanu,G., Sharlach,M., Zandbergen,F., Plutzky,J., 2007. PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation? *J Intern Med* 262, 184-198.
- Akula,K.K., Dhir,A., Kulkarni,S.K., 2008. Rofecoxib, a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor increases pentylentetrazol seizure threshold in mice: possible involvement of adenosinergic mechanism. *Epilepsy Res* 78, 60-70.
- Appleton,D.B., DeVivo,D.C., 1974. An animal model for the ketogenic diet. *Epilepsia* 15, 211-227.
- Auvin,S., Sankar,R., 2008. Inflammation, Epilepsy, and Anti-inflammatory Therapies. In: Pellock JM, Bourgeois B, Dodson W, Nordli DR, Jr, Sankar R, eds *Pediatric Epilepsy: Diagnosis and Therapy* New York: Demos Medical Publishing.
- Auvin,S., Shin,D., Mazarati,A., Sankar,R., 2006. The utility of testing pentylentetrazol threshold. *Epilepsia* 47, 662-663.
- Barbier,O., Torra,I.P., Duguay,Y., Blanquart,C., Fruchart,J.C., Glineur,C., Staels,B., 2002. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 717-726.
- Baumeister,F.A., Oberhoffer,R., Liebhaber,G.M., Kunkel,J., Eberhardt,J., Holthausen,H., Peters,J., 2004. Fatal propofol infusion syndrome in association with ketogenic diet. *Neuropediatrics* 35, 250-252.
- Bautista,R.E., 2003. The use of the ketogenic diet in a patient with subacute sclerosing panencephalitis. *Seizure* 12, 175-177.
- Bergqvist,A.G., Chee,C.M., Lutchka,L., Rychik,J., Stallings,V.A., 2003. Selenium deficiency associated with cardiomyopathy: a complication of the ketogenic diet. *Epilepsia* 44, 618-620.
- Bergqvist,A.G., Chee,C.M., Lutchka,L.M., Brooks-Kayal,A.R., 1999. Treatment of acquired epileptic aphasia with the ketogenic diet. *J Child Neurol* 14, 696-701.
- Bergqvist,A.G., Schall,J.I., Gallagher,P.R., Cnaan,A., Stallings,V.A., 2005. Fasting versus gradual initiation of the ketogenic diet: a prospective, randomized clinical trial of efficacy. *Epilepsia* 46, 1810-1819.
- Bergqvist,A.G., Schall,J.I., Stallings,V.A., 2007. Vitamin D status in children with intractable epilepsy, and impact of the ketogenic diet. *Epilepsia* 48, 66-71.
- Berry-Kravis,E., Booth,G., Sanchez,A.C., Woodbury-Kolb,J., 2001. Carnitine levels and the ketogenic diet. *Epilepsia* 42, 1445-1451.
- Best,T.H., Franz,D.N., Gilbert,D.L., Nelson,D.P., Epstein,M.R., 2000. Cardiac complications in pediatric patients on the ketogenic diet. *Neurology* 54, 2328-2330.
- Bialer,M., Johannessen,S.I., Kupferberg,H.J., Levy,R.H., Loiseau,P., Perucca,E., 2002. Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Sixth Eilat Conference (EILAT VI). *Epilepsy Res* 51, 31-71.

- Bishop-Bailey,D., 2000. Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 129, 823-834.
- Bixel,M.G., Hamprecht,B., 1995. Generation of ketone bodies from leucine by cultured astroglial cells. *J Neurochem* 65, 2450-2461.
- Blanquart,C., Barbier,O., Fruchart,J.C., Staels,B., Glineur,C., 2003. Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85, 267-273.
- BLIGH,E.G., DYER,W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917.
- Bodenant,M., Moreau,C., Sejourne,C., Auvin,S., Delval,A., Cuisset,J.M., Derambure,P., Destee,A., Defebvre,L., 2008. Intérêt du régime cétogène dans le traitement d'un état de mal épileptique résistant de l'adulte [Interest of the ketogenic diet in a refractory status epilepticus in adults]. *Rev Neurol (Paris)* 164, 194-199.
- Bough,K.J., Chen,R.S., Eagles,D.A., 1999a. Path analysis shows that increasing ketogenic ratio, but not beta-hydroxybutyrate, elevates seizure threshold in the Rat. *Dev Neurosci* 21, 400-406.
- Bough,K.J., Eagles,D.A., 1999. A ketogenic diet increases the resistance to pentylenetetrazole-induced seizures in the rat. *Epilepsia* 40, 138-143.
- Bough,K.J., Gudi,K., Han,F.T., Rathod,A.H., Eagles,D.A., 2002. An anticonvulsant profile of the ketogenic diet in the rat. *Epilepsy Res* 50, 313-325.
- Bough,K.J., Matthews,P.J., Eagles,D.A., 2000a. A ketogenic diet has different effects upon seizures induced by maximal electroshock and by pentylenetetrazole infusion. *Epilepsy Res* 38, 105-114.
- Bough,K.J., Paquet,M., Pare,J.F., Hassel,B., Smith,Y., Hall,R.A., Dingledine,R., 2007. Evidence against enhanced glutamate transport in the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet. *Epilepsy Res* 74, 232-236.
- Bough,K.J., Valiyil,R., Han,F.T., Eagles,D.A., 1999b. Seizure resistance is dependent upon age and calorie restriction in rats fed a ketogenic diet. *Epilepsy Res* 35, 21-28.
- Bough,K.J., Wetherington,J., Hassel,B., Pare,J.F., Gawryluk,J.W., Greene,J.G., Shaw,R., Smith,Y., Geiger,J.D., Dingledine,R.J., 2006. Mitochondrial biogenesis in the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet. *Ann Neurol* 60, 223-235.
- Bough,K.J., Yao,S.G., Eagles,D.A., 2000b. Higher ketogenic diet ratios confer protection from seizures without neurotoxicity. *Epilepsy Res* 38, 15-25.
- Bourre,J.M., Dumont,O., Piciotti,M., Clement,M., Chaudiere,J., Bonneil,M., Nalbone,G., Lafont,H., Pascal,G., Durand,G., 1991. Essentiality of omega 3 fatty acids for brain structure and function. *World Rev Nutr Diet* 66, 103-117.
- 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, 187-190.
- Calder,P.C., 2005. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Biochem Soc Trans* 33, 423-427.

- Calder,P.C., 2006. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 83, 1505S-1519S.
- Cantello,R., Varrasi,C., Tarletti,R., Cecchin,M., D'Andrea,F., Veggiotti,P., Bellomo,G., Monaco,F., 2007. Ketogenic diet: electrophysiological effects on the normal human cortex. *Epilepsia* 48, 1756-1763.
- Caraballo,R.H., Cersosimo,R.O., Sakr,D., Cresta,A., Escobal,N., Fejerman,N., 2006. Ketogenic diet in patients with myoclonic-astatic epilepsy. *Epileptic Disord* 8, 151-155.
- Caraballo,R.H., Cersosimo,R.O., Sakr,D., Cresta,A., Escobal,N., Fejerman,N., 2005. Ketogenic diet in patients with Dravet syndrome. *Epilepsia* 46, 1539-1544.
- Cardinali,S., Canafoglia,L., Bertoli,S., Franceschetti,S., Lanzi,G., Tagliabue,A., Veggiotti,P., 2006. A pilot study of a ketogenic diet in patients with Lafora body disease. *Epilepsy Res* 69, 129-134.
- Carrette,E., Vonck,K., de,H., V, Dewaele,I., Raedt,R., Goossens,L., Van,Z.M., Wadman,W., Thadani,V., Boon,P., 2008. A pilot trial with modified Atkins' diet in adult patients with refractory epilepsy. *Clin Neurol Neurosurg*.
- Casebolt,T.L., Jope,R.S., 1989. Long-term lithium treatment selectively reduces receptor-coupled inositol phospholipid hydrolysis in rat brain. *Biol Psychiatry* 25, 329-340.
- Cavalheiro,E.A., 1995. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci* 16, 33-37.
- Cavalheiro,E.A., Naffah-Mazzacoratti,M.G., Mello,L., Leite,J.P., 2006. The pilocarpine model of seizures. Pitkanen, A , Schwartzkroin, P A , Moshe, S L (Eds) *Models of seizures and epilepsy Elsevier, Oxford, UK* 433-448.
- Cavalheiro,E.A., Silva,D.F., Turski,W.A., Calderazzo-Filho,L.S., Bortolotto,Z.A., Turski,L., 1987. The susceptibility of rats to pilocarpine-induced seizures is age-dependent. *Brain Res* 465, 43-58.
- Cheng,C.M., Hicks,K., Wang,J., Eagles,D.A., Bondy,C.A., 2004. Caloric restriction augments brain glutamic acid decarboxylase-65 and -67 expression. *J Neurosci Res* 77, 270-276.
- Clifford,D.B., Olney,J.W., Maniotis,A., Collins,R.C., Zorumski,C.F., 1987. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience* 23, 953-968.
- Coppola,G., Klepper,J., Ammendola,E., Fiorillo,M., della,C.R., Capano,G., Pascotto,A., 2006. The effects of the ketogenic diet in refractory partial seizures with reference to tuberous sclerosis. *Eur J Paediatr Neurol* 10, 148-151.
- Coppola,G., Veggiotti,P., Cusmai,R., Bertoli,S., Cardinali,S., onisi-Vici,C., Elia,M., Lispi,M.L., Sarnelli,C., Tagliabue,A., Toraldo,C., Pascotto,A., 2002. The ketogenic diet in children, adolescents and young adults with refractory epilepsy: an Italian multicentric experience. *Epilepsy Res* 48, 221-227.
- Cortez,M.A., Snead,O.C., III, 2006. Pharmacologic models of generalized absence seizures in rodents. Pitkanen, A , Schwartzkroin, P A , Moshe, S L (Eds) *Models of seizures and epilepsy Elsevier, Oxford, UK* 111-125.

- Cruickshank, J.W., Brudzynski, S.M., McLachlan, R.S., 1994. Involvement of M1 muscarinic receptors in the initiation of cholinergically induced epileptic seizures in the rat brain. *Brain Res* 643, 125-129.
- Cullingford, T.E., 2004. The ketogenic diet; fatty acids, fatty acid-activated receptors and neurological disorders. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70, 253-264.
- Cullingford, T.E., Bhakoo, K., Peuchen, S., Dolphin, C.T., Patel, R., Clark, J.B., 1998. Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. *J Neurochem* 70, 1366-1375.
- Cullingford, T.E., Dolphin, C.T., Sato, H., 2002a. The peroxisome proliferator-activated receptor alpha-selective activator ciprofibrate upregulates expression of genes encoding fatty acid oxidation and ketogenesis enzymes in rat brain. *Neuropharmacology* 42, 724-730.
- Cullingford, T.E., Eagles, D.A., Sato, H., 2002b. The ketogenic diet upregulates expression of the gene encoding the key ketogenic enzyme mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase in rat brain. *Epilepsy Res* 49, 99-107.
- Dahlin, M., Elfving, A., Ungerstedt, U., Amark, P., 2005. The ketogenic diet influences the levels of excitatory and inhibitory amino acids in the CSF in children with refractory epilepsy. *Epilepsy Res* 64, 115-125.
- Dahlin, M., Hjelte, L., Nilsson, S., Amark, P., 2007. Plasma phospholipid fatty acids are influenced by a ketogenic diet enriched with n-3 fatty acids in children with epilepsy. *Epilepsy Res* 73, 199-207.
- Dahlin, M.G., Beck, O.M., Amark, P.E., 2006. Plasma levels of antiepileptic drugs in children on the ketogenic diet. *Pediatr Neurol* 35, 6-10.
- Delerive, P., De, B.K., Besnard, S., Vanden, B.W., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Fruchart, J.C., Tedgui, A., Haegeman, G., Staels, B., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* 274, 32048-32054.
- Delerive, P., Gervois, P., Fruchart, J.C., Staels, B., 2000. Induction of IkappaBalpha expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators. *J Biol Chem* 275, 36703-36707.
- Dell, C.A., Likhodii, S.S., Musa, K., Ryan, M.A., Burnham, W.M., Cunnane, S.C., 2001. Lipid and fatty acid profiles in rats consuming different high-fat ketogenic diets. *Lipids* 36, 373-378.
- Deplanque, D., Gele, P., Petraut, O., Six, I., Furman, C., Bouly, M., Nion, S., Dupuis, B., Leys, D., Fruchart, J.C., Cecchelli, R., Staels, B., Duriez, P., Bordet, R., 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation as a mechanism of preventive neuroprotection induced by chronic fenofibrate treatment. *J Neurosci* 23, 6264-6271.
- Devchand, P.R., Keller, H., Peters, J.M., Vazquez, M., Gonzalez, F.J., Wahli, W., 1996. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 384, 39-43.
- DeVivo, D.C., Leckie, M.P., Ferrendelli, J.S., McDougal, D.B., Jr., 1978. Chronic ketosis and cerebral metabolism. *Ann Neurol* 3, 331-337.

- Dhir,A., Naidu,P.S., Kulkarni,S.K., 2006b. Effect of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors in various animal models (bicuculline, picrotoxin, maximal electroshock-induced convulsions) of epilepsy with possible mechanism of action. *Indian J Exp Biol* 44, 286-291.
- Dhir,A., Naidu,P.S., Kulkarni,S.K., 2006a. Effect of cyclooxygenase inhibitors on pentylenetetrazol (PTZ)-induced convulsions: Possible mechanism of action. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30, 1478-1485.
- Dube,C., Vezzani,A., Behrens,M., Bartfai,T., Baram,T.Z., 2005. Interleukin-1beta contributes to the generation of experimental febrile seizures. *Ann Neurol* 57, 152-155.
- DuBois,R.N., Abramson,S.B., Crofford,L., Gupta,R.A., Simon,L.S., van de Putte,L.B., Lipsky,P.E., 1998. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 12, 1063-1073.
- Eagles,D.A., Boyd,S.J., Kotak,A., Allan,F., 2003. Calorie restriction of a high-carbohydrate diet elevates the threshold of PTZ-induced seizures to values equal to those seen with a ketogenic diet. *Epilepsy Res* 54, 41-52.
- Edelstein,S.F., Chisholm,M., 1996. Management of intractable childhood seizures using the non-MCT oil ketogenic diet in 20 patients. *J Am Diet Assoc* 96, 1181-1182.
- Erecinska,M., Nelson,D., Daikhin,Y., Yudkoff,M., 1996. Regulation of GABA level in rat brain synaptosomes: fluxes through enzymes of the GABA shunt and effects of glutamate, calcium, and ketone bodies. *J Neurochem* 67, 2325-2334.
- Eun,S.H., Kang,H.C., Kim,D.W., Kim,H.D., 2006. Ketogenic diet for treatment of infantile spasms. *Brain Dev* 28, 566-571.
- Fernstrom,J.D., 1999. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on neuronal function. *Lipids* 34, 161-169.
- FOLCH,J., LEES,M., SLOANE STANLEY,G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226, 497-509.
- Fraser,D.D., Whiting,S., Andrew,R.D., Macdonald,E.A., Musa-Veloso,K., Cunnane,S.C., 2003. Elevated polyunsaturated fatty acids in blood serum obtained from children on the ketogenic diet. *Neurology* 60, 1026-1029.
- Freeman,J.M., Vining,E.P., Kossoff,E.H., Pyzik,P.L., Ye,X., Goodman,S.N., 2008. A blinded, crossover study of the efficacy of the ketogenic diet. *Epilepsia*.
- Freeman,J.M., Vining,E.P., Pillas,D.J., Pyzik,P.L., Casey,J.C., Kelly,L.M., 1998. The efficacy of the ketogenic diet-1998: a prospective evaluation of intervention in 150 children. *Pediatrics* 102, 1358-1363.
- Galabert,C., Jacquot,J., Zahm,J.M., Puchelle,E., 1987. Relationships between the lipid content and the rheological properties of airway secretions in cystic fibrosis. *Clin Chim Acta* 164, 139-149.
- Garriga-Canut,M., Schoenike,B., Qazi,R., Bergendahl,K., Daley,T.J., Pfender,R.M., Morrison,J.F., Ockuly,J., Stafstrom,C., Sutula,T., Roopra,A., 2006. 2-Deoxy-D-glucose reduces epilepsy progression by NRSF-CtBP-dependent metabolic regulation of chromatin structure. *Nat Neurosci* 9, 1382-1387.
- Gasior,M., French,A., Joy,M.T., Tang,R.S., Hartman,A.L., Rogawski,M.A., 2007. The anticonvulsant activity of acetone, the major ketone body in the ketogenic diet, is not

dependent on its metabolites acetol, 1,2-propanediol, methylglyoxal, or pyruvic acid. *Epilepsia* 48, 793-800.

Gottrand,F., 2007. Acides gras poly-insaturés et immunité. *Arch Pediatr* 14, 5-7.

Grau,R., az-Munoz,M.D., Cacheiro-Llaguno,C., Fresno,M., Iniguez,M.A., 2008. Role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the control of cyclooxygenase 2 and vascular endothelial growth factor: involvement in tumor growth. *PPAR Res* 2008, 352437.

Greene,A.E., Todorova,M.T., McGowan,R., Seyfried,T.N., 2001. Caloric restriction inhibits seizure susceptibility in epileptic EL mice by reducing blood glucose. *Epilepsia* 42, 1371-1378.

Haag,M., 2003. Essential fatty acids and the brain. *Can J Psychiatry* 48, 195-203.

Haas,R.H., Rice,M.A., Trauner,D.A., Merritt,T.A., 1986. Therapeutic effects of a ketogenic diet in Rett syndrome. *Am J Med Genet Suppl* 1, 225-246.

Hallbook,T., Kohler,S., Rosen,I., Lundgren,J., 2007a. Effects of ketogenic diet on epileptiform activity in children with therapy resistant epilepsy. *Epilepsy Res* 77, 134-140.

Hallbook,T., Lundgren,J., Rosen,I., 2007b. Ketogenic diet improves sleep quality in children with therapy-resistant epilepsy. *Epilepsia* 48, 59-65.

Harney,J.P., Madara,J., Madara,J., l'Anson,H., 2002. Effects of acute inhibition of fatty acid oxidation on latency to seizure and concentrations of beta hydroxybutyrate in plasma of rats maintained on calorie restriction and/or the ketogenic diet. *Epilepsy Res* 49, 239-246.

Hartman,A.L., Gasior,M., Vining,E.P., Rogawski,M.A., 2007. The neuropharmacology of the ketogenic diet. *Pediatr Neurol* 36, 281-292.

Hartman,A.L., Lyle,M., Rogawski,M.A., Gasior,M., 2008. Efficacy of the ketogenic diet in the 6-Hz seizure test. *Epilepsia* 49, 334-339.

Hemingway,C., Freeman,J.M., Pillas,D.J., Pyzik,P.L., 2001. The ketogenic diet: a 3- to 6-year follow-up of 150 children enrolled prospectively. *Pediatrics* 108, 898-905.

Holmes,G.L., 2007. Animal model studies application to human patients. *Neurology* 69, S28-S32.

Holmes,G.L., Riviello,J.J., Jr., 1999. Midazolam and pentobarbital for refractory status epilepticus. *Pediatr Neurol* 20, 259-264.

Hong,S., Gronert,K., Devchand,P.R., Moussignac,R.L., Serhan,C.N., 2003. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem* 278, 14677-14687.

Hori,A., Tandon,P., Holmes,G.L., Stafstrom,C.E., 1997. Ketogenic diet: effects on expression of kindled seizures and behavior in adult rats. *Epilepsia* 38, 750-758.

Hosain,S.A., La Vega-Talbott,M., Solomon,G.E., 2005. Ketogenic diet in pediatric epilepsy patients with gastrostomy feeding. *Pediatr Neurol* 32, 81-83.

Huttenlocher,P.R., Wilbourn,A.J., Signore,J.M., 1971. Medium-chain triglycerides as a therapy for intractable childhood epilepsy. *Neurology* 21, 1097-1103.

- ILAE, 1981. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia* 22, 489-501.
- ILAE, 1989. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 30, 389-399.
- Janmey, P.A., Kinnunen, P.K., 2006. Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends Cell Biol* 16, 538-546.
- Jarrett, S.G., Milder, J.B., Liang, L.P., Patel, M., 2008. The ketogenic diet increases mitochondrial glutathione levels. *J Neurochem*.
- Joep, R., 1979. Effects of lithium treatment in vitro and in vivo on acetylcholine metabolism in rat brain. *J Neurochem* 33, 487-495.
- Jung, D.E., Chung, J.Y., Kang, H.C., Kim, H.D., 2008. Improving tolerability of the ketogenic diet in patients with abnormal endoscopic findings. *Brain Dev* 30, 416-419.
- Kang, H.C., Chung, D.E., Kim, D.W., Kim, H.D., 2004. Early- and late-onset complications of the ketogenic diet for intractable epilepsy. *Epilepsia* 45, 1116-1123.
- Kang, H.C., Kim, H.D., Kim, D.W., 2006. Short-term trial of a liquid ketogenic milk to infants with West syndrome. *Brain Dev* 28, 67.
- Kang, H.C., Kim, Y.J., Kim, D.W., Kim, H.D., 2005. Efficacy and safety of the ketogenic diet for intractable childhood epilepsy: Korean multicentric experience. *Epilepsia* 46, 272-279.
- Kang, H.C., Lee, H.S., You, S.J., Kang, D.C., Ko, T.S., Kim, H.D., 2007a. Use of a modified Atkins diet in intractable childhood epilepsy. *Epilepsia* 48, 182-186.
- Kang, H.C., Lee, Y.M., Kim, H.D., Lee, J.S., Slama, A., 2007b. Safe and effective use of the ketogenic diet in children with epilepsy and mitochondrial respiratory chain complex defects. *Epilepsia* 48, 82-88.
- Kelley, K.A., Ho, L., Winger, D., Freire-Moar, J., Borelli, C.B., Aisen, P.S., Pasinetti, G.M., 1999. Potentiation of excitotoxicity in transgenic mice overexpressing neuronal cyclooxygenase-2. *Am J Pathol* 155, 995-1004.
- Keros, S., McBain, C.J., 1997. Arachidonic acid inhibits transient potassium currents and broadens action potentials during electrographic seizures in hippocampal pyramidal and inhibitory interneurons. *J Neurosci* 17, 3476-3487.
- Kersten, S., Mandard, S., Escher, P., Gonzalez, F.J., Tafuri, S., Desvergne, B., Wahli, W., 2001. The peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates amino acid metabolism. *FASEB J* 15, 1971-1978.
- Kielbaso, S., Koo, H.P., Bloom, D.A., Faerber, G.J., 2000. Nephrolithiasis associated with the ketogenic diet. *J Urol* 164, 464-466.
- Kim, D.K., Jang, T.J., 2006. Cyclooxygenase-2 expression and effect of celecoxib in flurothyl-induced neonatal seizure. *Int J Exp Pathol* 87, 73-78.
- Kim, D.W., Kang, H.C., Park, J.C., Kim, H.D., 2004. Benefits of the nonfasting ketogenic diet compared with the initial fasting ketogenic diet. *Pediatrics* 114, 1627-1630.

- King, J.T., Jr., LaMotte, C.C., 1989. El mouse as a model of focal epilepsy: a review. *Epilepsia* 30, 257-265.
- Kinsman, S.L., Vining, E.P., Quaskey, S.A., Mellits, D., Freeman, J.M., 1992. Efficacy of the ketogenic diet for intractable seizure disorders: review of 58 cases. *Epilepsia* 33, 1132-1136.
- Klepper, J., Diefenbach, S., Kohlschutter, A., Voit, T., 2004. Effects of the ketogenic diet in the glucose transporter 1 deficiency syndrome. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70, 321-327.
- Kliwer, S.A., Sundseth, S.S., Jones, S.A., Brown, P.J., Wisely, G.B., Koble, C.S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T.M., Lenhard, J.M., Lehmann, J.M., 1997. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4318-4323.
- Kossoff, E.H., Krauss, G.L., McGrogan, J.R., Freeman, J.M., 2003. Efficacy of the Atkins diet as therapy for intractable epilepsy. *Neurology* 61, 1789-1791.
- Kossoff, E.H., Laux, L.C., Blackford, R., Morrison, P.F., Pyzik, P.L., Hamdy, R.M., Turner, Z., Nordli, D.R., Jr., 2008a. When do seizures usually improve with the ketogenic diet? *Epilepsia* 49, 329-333.
- Kossoff, E.H., McGrogan, J.R., 2005. Worldwide use of the ketogenic diet. *Epilepsia* 46, 280-289.
- Kossoff, E.H., McGrogan, J.R., Bluml, R.M., Pillas, D.J., Rubenstein, J.E., Vining, E.P., 2006. A modified Atkins diet is effective for the treatment of intractable pediatric epilepsy. *Epilepsia* 47, 421-424.
- Kossoff, E.H., McGrogan, J.R., Freeman, J.M., 2004a. Benefits of an all-liquid ketogenic diet. *Epilepsia* 45, 1163.
- Kossoff, E.H., Pyzik, P.L., Furth, S.L., Hladky, H.D., Freeman, J.M., Vining, E.P., 2002a. Kidney stones, carbonic anhydrase inhibitors, and the ketogenic diet. *Epilepsia* 43, 1168-1171.
- Kossoff, E.H., Pyzik, P.L., McGrogan, J.R., Rubenstein, J.E., 2004b. The impact of early versus late anticonvulsant reduction after ketogenic diet initiation. *Epilepsy Behav* 5, 499-502.
- Kossoff, E.H., Pyzik, P.L., McGrogan, J.R., Vining, E.P., Freeman, J.M., 2002b. Efficacy of the ketogenic diet for infantile spasms. *Pediatrics* 109, 780-783.
- Kossoff, E.H., Rowley, H., Sinha, S.R., Vining, E.P., 2008b. A prospective study of the modified Atkins diet for intractable epilepsy in adults. *Epilepsia* 49, 316-319.
- Kossoff, E.H., Thiele, E.A., Pfeifer, H.H., McGrogan, J.R., Freeman, J.M., 2005. Tuberous sclerosis complex and the ketogenic diet. *Epilepsia* 46, 1684-1686.
- Kossoff, E.H., Turner, Z., Bluml, R.M., Pyzik, P.L., Vining, E.P., 2007. A randomized, crossover comparison of daily carbohydrate limits using the modified Atkins diet. *Epilepsy Behav* 10, 432-436.
- Kovacs, R., Schuchmann, S., Gabriel, S., Kann, O., Kardos, J., Heinemann, U., 2002. Free radical-mediated cell damage after experimental status epilepticus in hippocampal slice cultures. *J Neurophysiol* 88, 2909-2918.

- Kreisler,A., Gele,P., Wiart,J.F., Lhermitte,M., Destee,A., Bordet,R., 2007. Lipid-lowering drugs in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: fenofibrate has a neuroprotective effect, whereas bezafibrate and HMG-CoA reductase inhibitors do not. *Brain Res* 1135, 77-84.
- Kuhar,M., Yamamura,H.I., 1976. Localization of cholinergic muscarinic receptors in rat brain by light microscopic radioautography. *Brain Res* 110, 229-243.
- Kwiterovich,P.O., Jr., Vining,E.P., Pyzik,P., Skolasky,R., Jr., Freeman,J.M., 2003. Effect of a high-fat ketogenic diet on plasma levels of lipids, lipoproteins, and apolipoproteins in children. *JAMA* 290, 912-920.
- Kwon,Y.S., Jeong,S.W., Kim,D.W., Choi,E.S., Son,B.K., 2008. Effects of the ketogenic diet on neurogenesis after kainic acid-induced seizures in mice. *Epilepsy Res* 78, 186-194.
- Lalwani,N.D., Reddy,M.K., Qureshi,S.A., Sirtori,C.R., Abiko,Y., Reddy,J.K., 1983. Evaluation of selected hypolipidemic agents for the induction of peroxisomal enzymes and peroxisome proliferation in the rat liver. *Hum Toxicol* 2, 27-48.
- Landmark,C.J., 2007. Targets for antiepileptic drugs in the synapse. *Med Sci Monit* 13, RA1-RA7.
- Lauritzen,I., Blondeau,N., Heurteaux,C., Widmann,C., Romey,G., Lazdunski,M., 2000. Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *EMBO J* 19, 1784-1793.
- Lee,J.K., Won,J.S., Singh,A.K., Singh,I., 2008. Statin inhibits kainic acid-induced seizure and associated inflammation and hippocampal cell death. *Neurosci Lett* 440, 260-264.
- Lemos,T., Cavalheiro,E.A., 1995. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. *Exp Brain Res* 102, 423-428.
- Leone,T.C., Weinheimer,C.J., Kelly,D.P., 1999. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7473-7478.
- Lian,X.Y., Khan,F.A., Stringer,J.L., 2007. Fructose-1,6-bisphosphate has anticonvulsant activity in models of acute seizures in adult rats. *J Neurosci* 27, 12007-12011.
- Liebhaber,G.M., Riemann,E., Baumeister,F.A., 2003. Ketogenic diet in Rett syndrome. *J Child Neurol* 18, 74-75.
- Lightstone,L., Shinnar,S., Callahan,C.M., O'Dell,C., Moshe,S.L., Ballaban-Gil,K.R., 2001. Reasons for failure of the ketogenic diet. *J Neurosci Nurs* 33, 292-295.
- Likhodii,S.S., Burnham,W.M., 2002. Ketogenic diet: does acetone stop seizures? *Med Sci Monit* 8, HY19-HY24.
- Likhodii,S.S., Musa,K., Mendonca,A., Dell,C., Burnham,W.M., Cunnane,S.C., 2000. Dietary fat, ketosis, and seizure resistance in rats on the ketogenic diet. *Epilepsia* 41, 1400-1410.
- Likhodii,S.S., Serbanescu,I., Cortez,M.A., Murphy,P., Snead,O.C., III, Burnham,W.M., 2003. Anticonvulsant properties of acetone, a brain ketone elevated by the ketogenic diet. *Ann Neurol* 54, 219-226.
- Little,S.J., Lynch,M.A., Manku,M., Nicolaou,A., 2007. Docosahexaenoic acid-induced changes in phospholipids in cortex of young and aged rats: a lipidomic analysis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77, 155-162.

- Loscher, W., Honack, D., Fassbender, C.P., Nolting, B., 1991. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III. Pentylentetrazole seizure models. *Epilepsy Res* 8, 171-189.
- Ma, W., Berg, J., Yellen, G., 2007. Ketogenic diet metabolites reduce firing in central neurons by opening K(ATP) channels. *J Neurosci* 27, 3618-3625.
- Maalouf, M., Sullivan, P.G., Davis, L., Kim, D.Y., Rho, J.M., 2007. Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience* 145, 256-264.
- Madej, A., Okopien, B., Kowalski, J., Zielinski, M., Wysocki, J., Szygula, B., Kalina, Z., Herman, Z.S., 1998. Effects of fenofibrate on plasma cytokine concentrations in patients with atherosclerosis and hyperlipoproteinemia IIb. *Int J Clin Pharmacol Ther* 36, 345-349.
- Mady, M.A., Kossoff, E.H., McGregor, A.L., Wheless, J.W., Pyzik, P.L., Freeman, J.M., 2003. The ketogenic diet: adolescents can do it, too. *Epilepsia* 44, 847-851.
- Mahoney, A.W., Hendricks, D.G., Bernhard, N., Sisson, D.V., 1983. Fasting and ketogenic diet effects on audiogenic seizures susceptibility of magnesium deficient rats. *Pharmacol Biochem Behav* 18, 683-687.
- Mak, S.C., Chi, C.S., Wan, C.J., 1999. Clinical experience of ketogenic diet on children with refractory epilepsy. *Acta Paediatr Taiwan* 40, 97-100.
- Mandhane, S.N., Aavula, K., Rajamannar, T., 2007. Timed pentylentetrazol infusion test: a comparative analysis with s.c.PTZ and MES models of anticonvulsant screening in mice. *Seizure* 16, 636-644.
- Mantis, J.G., Centeno, N.A., Todorova, M.T., McGowan, R., Seyfried, T.N., 2004. Management of multifactorial idiopathic epilepsy in EL mice with caloric restriction and the ketogenic diet: role of glucose and ketone bodies. *Nutr Metab (Lond)* 1, 11.
- Marcheselli, V.L., Hong, S., Lukiw, W.J., Tian, X.H., Gronert, K., Musto, A., Hardy, M., Gimenez, J.M., Chiang, N., Serhan, C.N., Bazan, N.G., 2003. Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *J Biol Chem* 278, 43807-43817.
- Marinho, M.M., de Sousa, F.C., de, B., V, Vale, M.R., Viana, G.S., 1998. Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. *Neurochem Int* 33, 299-306.
- Martillotti, J., Weinshenker, D., Liles, L.C., Eagles, D.A., 2006. A ketogenic diet and knockout of the norepinephrine transporter both reduce seizure severity in mice. *Epilepsy Res* 68, 207-211.
- Masino, S.A., Geiger, J.D., 2008. Are purines mediators of the anticonvulsant/neuroprotective effects of ketogenic diets? *Trends Neurosci* 31, 273-278.
- Maurois, P., Rocchi, S., Pages, N., Bac, P., Stables, J.P., Gressens, P., Vamecq, J., 2008. The PPARgamma agonist FMOC-I-leucine protects both mature and immature brain. *Biomed Pharmacother* 62, 259-263.
- Meldrum, B., 2002. Do preclinical seizure models preselect certain adverse effects of antiepileptic drugs. *Epilepsy Res* 50, 33-40.

- Melo,T.M., Nehlig,A., Sonnewald,U., 2006. Neuronal-glia interactions in rats fed a ketogenic diet. *Neurochem Int* 48, 498-507.
- MILLICHAP,J.G., JONES,J.D., RUDIS,B.P., 1964. MECHANISM OF ANTICONVULSANT ACTION OF KETOGENIC DIET. STUDIES IN ANIMALS WITH EXPERIMENTAL SEIZURES AND IN CHILDREN WITH PETIT MAL EPILEPSY. *Am J Dis Child* 107, 593-604.
- Moraes,L.A., Piqueras,L., Bishop-Bailey,D., 2006. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther* 110, 371-385.
- Moreno,S., Farioli-Vecchioli,S., Ceru,M.P., 2004. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience* 123, 131-145.
- Moriguchi,T., Loewke,J., Garrison,M., Catalan,J.N., Salem,N., Jr., 2001. Reversal of docosahexaenoic acid deficiency in the rat brain, retina, liver, and serum. *J Lipid Res* 42, 419-427.
- Morris,A.A., 2005. Cerebral ketone body metabolism. *J Inherit Metab Dis* 28, 109-121.
- MORRISON,W.R., SMITH,L.M., 1964. PREPARATION OF FATTY ACID METHYL ESTERS AND DIMETHYLACETALS FROM LIPIDS WITH BORON FLUORIDE--METHANOL. *J Lipid Res* 5, 600-608.
- Muller-Schwarze,A.B., Tandon,P., Liu,Z., Yang,Y., Holmes,G.L., Stafstrom,C.E., 1999. Ketogenic diet reduces spontaneous seizures and mossy fiber sprouting in the kainic acid model. *Neuroreport* 10, 1517-1522.
- Musa-Veloso,K., Likhodii,S.S., Rarama,E., Benoit,S., Liu,Y.M., Chartrand,D., Curtis,R., Carmant,L., Lortie,A., Comeau,F.J., Cunnane,S.C., 2006. Breath acetone predicts plasma ketone bodies in children with epilepsy on a ketogenic diet. *Nutrition* 22, 1-8.
- Nagy,T.R., Clair,A.L., 2000. Precision and accuracy of dual-energy X-ray absorptiometry for determining in vivo body composition of mice. *Obes Res* 8, 392-398.
- Nakazawa,M., Kodama,S., Matsuo,T., 1983. Effects of ketogenic diet on electroconvulsive threshold and brain contents of adenosine nucleotides. *Brain Dev* 5, 375-380.
- Neal,E.G., Chaffe,H., Schwartz,R.H., Lawson,M.S., Edwards,N., Fitzsimmons,G., Whitney,A., Cross,J.H., 2008. The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomised controlled trial. *Lancet Neurol* 7, 500-506.
- Nehlig,A., 2004. Brain uptake and metabolism of ketone bodies in animal models. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70, 265-275.
- Nehlig,A., 1999. Age-dependent pathways of brain energy metabolism: the suckling rat, a natural model of the ketogenic diet. *Epilepsy Res* 37, 211-221.
- Noh,H.S., Hah,Y.S., Nilufar,R., Han,J., Bong,J.H., Kang,S.S., Cho,G.J., Choi,W.S., 2006a. Acetoacetate protects neuronal cells from oxidative glutamate toxicity. *J Neurosci Res* 83, 702-709.
- Noh,H.S., Kang,S.S., Kim,D.W., Kim,Y.H., Park,C.H., Han,J.Y., Cho,G.J., Choi,W.S., 2005a. Ketogenic diet increases calbindin-D28k in the hippocampi of male ICR mice with kainic acid seizures. *Epilepsy Res* 65, 153-159.

- Noh,H.S., Kim,D.W., Kang,S.S., Cho,G.J., Choi,W.S., 2005b. Ketogenic diet prevents clusterin accumulation induced by kainic acid in the hippocampus of male ICR mice. *Brain Res* 1042, 114-118.
- Noh,H.S., Kim,Y.S., Kim,Y.H., Han,J.Y., Park,C.H., Kang,A.K., Shin,H.S., Kang,S.S., Cho,G.J., Choi,W.S., 2006b. Ketogenic diet protects the hippocampus from kainic acid toxicity by inhibiting the dissociation of bad from 14-3-3. *J Neurosci Res* 84, 1829-1836.
- Noh,H.S., Kim,Y.S., Lee,H.P., Chung,K.M., Kim,D.W., Kang,S.S., Cho,G.J., Choi,W.S., 2003. The protective effect of a ketogenic diet on kainic acid-induced hippocampal cell death in the male ICR mice. *Epilepsy Res* 53, 119-128.
- Nordli,D.R., Jr., Kuroda,M.M., Carroll,J., Koenigsberger,D.Y., Hirsch,L.J., Bruner,H.J., Seidel,W.T., De,V., 2001. Experience with the ketogenic diet in infants. *Pediatrics* 108, 129-133.
- Nylen,K., Likhodii,S., Abdelmalik,P.A., Clarke,J., Burnham,W.M., 2005. A comparison of the ability of a 4:1 ketogenic diet and a 6.3:1 ketogenic diet to elevate seizure thresholds in adult and young rats. *Epilepsia* 46, 1198-1204.
- Nylen,K., Likhodii,S.S., Hum,K.M., Burnham,W.M., 2006. A ketogenic diet and diallyl sulfide do not elevate afterdischarge thresholds in adult kindled rats. *Epilepsy Res* 71, 23-31.
- Nylen,K., Velazquez,J.L., Likhodii,S.S., Cortez,M.A., Shen,L., Leshchenko,Y., Adeli,K., Gibson,K.M., Burnham,W.M., Snead,O.C., III, 2008. A ketogenic diet rescues the murine succinic semialdehyde dehydrogenase deficient phenotype. *Exp Neurol* 210, 449-457.
- Oliveira,M.S., Furian,A.F., Royes,L.F., Figuera,M.R., Fiorenza,N.G., Castelli,M., Machado,P., Bohrer,D., Veiga,M., Ferreira,J., Cavalheiro,E.A., Mello,C.F., 2008. Cyclooxygenase-2/PGE2 pathway facilitates pentylentetrazol-induced seizures. *Epilepsy Res* 79, 14-21.
- Ormandy,G.C., Song,L., Jope,R.S., 1991. Analysis of the convulsant-potentiating effects of lithium in rats. *Exp Neurol* 111, 356-361.
- Otani,K., Yamatodani,A., Wada,H., Mimaki,T., Yabuuchi,H., 1984. [Effect of ketogenic diet on the convulsive threshold and brain amino acid and monoamine levels in young mice]. *No To Hattatsu* 16, 196-204.
- Pan,J.W., Bebin,E.M., Chu,W.J., Hetherington,H.P., 1999. Ketosis and epilepsy: 31P spectroscopic imaging at 4.1 T. *Epilepsia* 40, 703-707.
- Pascual,J.M., Wang,D., Lecumberri,B., Yang,H., Mao,X., Yang,R., De,V., 2004. GLUT1 deficiency and other glucose transporter diseases. *Eur J Endocrinol* 150, 627-633.
- Peterman,M.G., 1925. The ketogenic diet in epilepsy. *JAMA* 84, 1979-1983.
- Peterson,S.J., Tangney,C.C., Pimentel-Zablah,E.M., Hjelmgren,B., Booth,G., Berry-Kravis,E., 2005. Changes in growth and seizure reduction in children on the ketogenic diet as a treatment for intractable epilepsy. *J Am Diet Assoc* 105, 718-725.
- Picot,M.C., Baldy-Moulinier,M., Daures,J.P., Dujols,P., Crespel,A., 2008. The prevalence of epilepsy and pharmaco-resistant epilepsy in adults: A population-based study in a Western European country. *Epilepsia*.

- Poling, J.S., Vicini, S., Rogawski, M.A., Salem, N., Jr., 1996. Docosahexaenoic acid block of neuronal voltage-gated K⁺ channels: subunit selective antagonism by zinc. *Neuropharmacology* 35, 969-982.
- Pollack, G.M., Shen, D.D., 1985. A timed intravenous pentylenetetrazol infusion seizure model for quantitating the anticonvulsant effect of valproic acid in the rat. *J Pharmacol Methods* 13, 135-146.
- Poynter, M.E., Daynes, R.A., 1998. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem* 273, 32833-32841.
- Priel, M.R., dos Santos, N.F., Cavalheiro, E.A., 1996. Developmental aspects of the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res* 26, 115-121.
- Pulsifer, M.B., Gordon, J.M., Brandt, J., Vining, E.P., Freeman, J.M., 2001. Effects of ketogenic diet on development and behavior: preliminary report of a prospective study. *Dev Med Child Neurol* 43, 301-306.
- Rabinovitz, S., Mostofsky, D.I., Yehuda, S., 2004. Anticonvulsant efficiency, behavioral performance and cortisol levels: a comparison of carbamazepine (CBZ) and a fatty acid compound (SR-3). *Psychoneuroendocrinology* 29, 113-124.
- Racine, R.J., 1972. Modification of seizure activity by electrical stimulation: IIR Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32, 281-294.
- Raffo, E., Francois, J., Ferrandon, A., Koning, E., Nehlig, A., 2008. Calorie-restricted ketogenic diet increases thresholds to all patterns of pentylenetetrazol-induced seizures: critical importance of electroclinical assessment. *Epilepsia* 49, 320-328.
- Rapoport, S.I., 2003. In vivo approaches to quantifying and imaging brain arachidonic and docosahexaenoic acid metabolism. *J Pediatr* 143, S26-S34.
- Remahl, S., Dahlin, M.G., Amark, P.E., 2008. Influence of the ketogenic diet on 24-hour electroencephalogram in children with epilepsy. *Pediatr Neurol* 38, 38-43.
- Rho, J.M., Anderson, G.D., Donevan, S.D., White, H.S., 2002. Acetoacetate, acetone, and dibenzylamine (a contaminant in l-(+)-beta-hydroxybutyrate) exhibit direct anticonvulsant actions in vivo. *Epilepsia* 43, 358-361.
- Rho, J.M., Kim, D.W., Robbins, C.A., Anderson, G.D., Schwartzkroin, P.A., 1999. Age-dependent differences in flurothyl seizure sensitivity in mice treated with a ketogenic diet. *Epilepsy Res* 37, 233-240.
- Ribeiro, M.C., de Avila, D.S., Schneider, C.Y., Hermes, F.S., Furian, A.F., Oliveira, M.S., Rubin, M.A., Lehmann, M., Krieglstein, J., Mello, C.F., 2005. alpha-Tocopherol protects against pentylenetetrazol- and methylmalonate-induced convulsions. *Epilepsy Res* 66, 185-194.
- Rodriguez, J.C., Gil-Gomez, G., Hegardt, F.G., Haro, D., 1994. Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. *J Biol Chem* 269, 18767-18772.
- Rogers, A., 1979. Nutrition. In Baker, H., Lindsey, Weisbroth, S. (Eds). *The laboratory rat*. Academic press, Orlando.

- Rubenstein,J.E., Kossoff,E.H., Pyzik,P.L., Vining,E.P., McGrogan,J.R., Freeman,J.M., 2005. Experience in the use of the ketogenic diet as early therapy. *J Child Neurol* 20, 31-34.
- Samala,R., Willis,S., Borges,K., 2008. Anticonvulsant profile of a balanced ketogenic diet in acute mouse seizure models. *Epilepsy Res*.
- Sampath,A., Kossoff,E.H., Furth,S.L., Pyzik,P.L., Vining,E.P., 2007. Kidney stones and the ketogenic diet: risk factors and prevention. *J Child Neurol* 22, 375-378.
- Sander,J.W., 1993. Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. *Epilepsia* 34, 1007-1016.
- Sayyah,M., Javad-Pour,M., Ghazi-Khansari,M., 2003. The bacterial endotoxin lipopolysaccharide enhances seizure susceptibility in mice: involvement of proinflammatory factors: nitric oxide and prostaglandins. *Neuroscience* 122, 1073-1080.
- Schlanger,S., Shinitzky,M., Yam,D., 2002. Diet enriched with omega-3 fatty acids alleviates convulsion symptoms in epilepsy patients. *Epilepsia* 43, 103-104.
- Schwartz,R.H., Eaton,J., Bower,B.D., ynsley-Green,A., 1989. Ketogenic diets in the treatment of epilepsy: short-term clinical effects. *Dev Med Child Neurol* 31, 145-151.
- Seo,J.H., Lee,Y.M., Lee,J.S., Kang,H.C., Kim,H.D., 2007. Efficacy and tolerability of the ketogenic diet according to lipid:nonlipid ratios--comparison of 3:1 with 4:1 diet. *Epilepsia* 48, 801-805.
- Sheikh,K., Camejo,G., Lanne,B., Halvarsson,T., Landergren,M.R., Oakes,N.D., 2007. Beyond lipids, pharmacological PPARalpha activation has important effects on amino acid metabolism as studied in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, E1157-E1165.
- Sim,A.K., Spencer,A., Metz,G., Rushton,B., 1981. Effect of hypolipidaemic drugs on hepatomegaly and micro-bodies in the rat. A new approach to the nature of hepatic peroxisomal proliferation. *Arzneimittelforschung* 31, 1119-1126.
- Simopoulos,A.P., 2002. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr* 21, 495-505.
- Sirven,J., Whedon,B., Caplan,D., Liporace,J., Glosser,D., O'Dwyer,J., Sperling,M.R., 1999. The ketogenic diet for intractable epilepsy in adults: preliminary results. *Epilepsia* 40, 1721-1726.
- Squires,R.F., Saederup,E., Crawley,J.N., Skolnick,P., Paul,S.M., 1984. Convulsant potencies of tetrazoles are highly correlated with actions on GABA/benzodiazepine/picrotoxin receptor complexes in brain. *Life Sci* 35, 1439-1444.
- Stafstrom,C.E., Wang,C., Jensen,F.E., 1999. Electrophysiological observations in hippocampal slices from rats treated with the ketogenic diet. *Dev Neurosci* 21, 393-399.
- Stefan,H., Feuerstein,T.J., 2007. Novel anticonvulsant drugs. *Pharmacol Ther* 113, 165-183.
- Stewart,W.A., Gordon,K., Camfield,P., 2001. Acute pancreatitis causing death in a child on the ketogenic diet. *J Child Neurol* 16, 682.
- Su,S.W., Cilio,M.R., Sogawa,Y., Silveira,D.C., Holmes,G.L., Stafstrom,C.E., 2000. Timing of ketogenic diet initiation in an experimental epilepsy model. *Brain Res Dev Brain Res* 125, 131-138.

- Sullivan,P.G., Rippey,N.A., Dorenbos,K., Concepcion,R.C., Agarwal,A.K., Rho,J.M., 2004. The ketogenic diet increases mitochondrial uncoupling protein levels and activity. *Ann Neurol* 55, 576-580.
- Szot,P., Weinshenker,D., Rho,J.M., Storey,T.W., Schwartzkroin,P.A., 2001. Norepinephrine is required for the anticonvulsant effect of the ketogenic diet. *Brain Res Dev Brain Res* 129, 211-214.
- Szot,P., Weinshenker,D., White,S.S., Robbins,C.A., Rust,N.C., Schwartzkroin,P.A., Palmiter,R.D., 1999. Norepinephrine-deficient mice have increased susceptibility to seizure-inducing stimuli. *J Neurosci* 19, 10985-10992.
- Taha,A.Y., Baghiu,B.M., Lui,R., Nylén,K., Ma,D.W., Burnham,W.M., 2006. Lack of benefit of linoleic and alpha-linolenic polyunsaturated fatty acids on seizure latency, duration, severity or incidence in rats. *Epilepsy Res* 71, 40-46.
- Taha,A.Y., Filo,E., Ma,D.W., McIntyre,B.W., 2008a. Dose-dependent anticonvulsant effects of linoleic and alpha-linolenic polyunsaturated fatty acids on pentylenetetrazol induced seizures in rats. *Epilepsia*.
- Taha,A.Y., Huot,P.S., Reza-Lopez,S., Prayitno,N.R., Kang,J.X., Burnham,W.M., Ma,D.W., 2008b. Seizure resistance in fat-1 transgenic mice endogenously synthesizing high levels of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Neurochem* 105, 380-388.
- Taha,A.Y., Ryan,M.A., Cunnane,S.C., 2005. Despite transient ketosis, the classic high-fat ketogenic diet induces marked changes in fatty acid metabolism in rats. *Metabolism* 54, 1127-1132.
- Tai,K.K., Truong,D.D., 2007. Ketogenic diet prevents seizure and reduces myoclonic jerks in rats with cardiac arrest-induced cerebral hypoxia. *Neurosci Lett* 425, 34-38.
- Takeoka,M., Riviello,J.J., Jr., Pfeifer,H., Thiele,E.A., 2002. Concomitant treatment with topiramate and ketogenic diet in pediatric epilepsy. *Epilepsia* 43, 1072-1075.
- Talbot,F.B., 1930. *Treatment of epilepsy*. New York:MacMillan.
- Tanaka,K., Smith,P.F., Stromberg,P.C., Eydeloth,R.S., Herold,E.G., Grossman,S.J., Frank,J.D., Hertzog,P.R., Soper,K.A., Keenan,K.P., 1992. Studies of early hepatocellular proliferation and peroxisomal proliferation in Sprague-Dawley rats treated with tumorigenic doses of clofibrate. *Toxicol Appl Pharmacol* 116, 71-77.
- Thavendiranathan,P., Chow,C., Cunnane,S., McIntyre,B.W., 2003. The effect of the 'classic' ketogenic diet on animal seizure models. *Brain Res* 959, 206-213.
- Thavendiranathan,P., Mendonca,A., Dell,C., Likhodii,S.S., Musa,K., Iracleous,C., Cunnane,S.C., Burnham,W.M., 2000. The MCT ketogenic diet: effects on animal seizure models. *Exp Neurol* 161, 696-703.
- Thio,L.L., Wong,M., Yamada,K.A., 2000. Ketone bodies do not directly alter excitatory or inhibitory hippocampal synaptic transmission. *Neurology* 54, 325-331.
- Tinoco,J., 1982. Dietary requirements and functions of alpha-linolenic acid in animals. *Prog Lipid Res* 21, 1-45.

- Todorova, M.T., Tandon, P., Madore, R.A., Stafstrom, C.E., Seyfried, T.N., 2000. The ketogenic diet inhibits epileptogenesis in EL mice: a genetic model for idiopathic epilepsy. *Epilepsia* 41, 933-940.
- Toyama, T., Nakamura, H., Harano, Y., Yamauchi, N., Morita, A., Kirishima, T., Minami, M., Itoh, Y., Okanou, T., 2004. PPAR α ligands activate antioxidant enzymes and suppress hepatic fibrosis in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 697-704.
- Trauner, D.A., 1985. Medium-chain triglyceride (MCT) diet in intractable seizure disorders. *Neurology* 35, 237-238.
- Turski, L., Cavalheiro, E.A., Czuczwar, S.J., Turski, W.A., Kleinrok, Z., 1987. The seizures induced by pilocarpine: behavioral, electroencephalographic and neuropathological studies in rodents. *Pol J Pharmacol Pharm* 39, 545-555.
- Turski, W.A., Cavalheiro, E.A., Schwarz, M., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z., Turski, L., 1983. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 9, 315-335.
- Uhlemann, E.R., Neims, A.H., 1972. Anticonvulsant properties of the ketogenic diet in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 180, 231-238.
- Valencia, I., Pfeifer, H., Thiele, E.A., 2002. General anesthesia and the ketogenic diet: clinical experience in nine patients. *Epilepsia* 43, 525-529.
- Vamecq, J., Vallee, L., Lesage, F., Gressens, P., Stables, J.P., 2005. Antiepileptic popular ketogenic diet: emerging twists in an ancient story. *Prog Neurobiol* 75, 1-28.
- Velisek, L., 2006. Models of chemically-induced acute seizures. Pitkanen, A, Schwartzkroin, P A, Moshe, S L (Eds) *Models of seizures and epilepsy* Elsevier, Oxford, UK 127-152.
- Vezzani, A., Granata, T., 2005. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia* 46, 1724-1743.
- Vezzani, A., Moneta, D., Richichi, C., Aliprandi, M., Burrows, S.J., Ravizza, T., Perego, C., De Simoni, M.G., 2002. Functional role of inflammatory cytokines and antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. *Epilepsia* 43 Suppl 5, 30-35.
- Vining, E.P., Freeman, J.M., Ballaban-Gil, K., Camfield, C.S., Camfield, P.R., Holmes, G.L., Shinnar, S., Shuman, R., Trevathan, E., Wheless, J.W., 1998. A multicenter study of the efficacy of the ketogenic diet. *Arch Neurol* 55, 1433-1437.
- Vining, E.P., Pyzik, P., McGrogan, J., Hladky, H., Anand, A., Kriegler, S., Freeman, J.M., 2002. Growth of children on the ketogenic diet. *Dev Med Child Neurol* 44, 796-802.
- Voskuyl, R.A., Vreugdenhil, M., Kang, J.X., Leaf, A., 1998. Anticonvulsant effect of polyunsaturated fatty acids in rats, using the cortical stimulation model. *Eur J Pharmacol* 341, 145-152.
- Vreugdenhil, M., Bruehl, C., Voskuyl, R.A., Kang, J.X., Leaf, A., Wadman, W.J., 1996. Polyunsaturated fatty acids modulate sodium and calcium currents in CA1 neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12559-12563.
- Wang, Z.J., Bergqvist, C., Hunter, J.V., Jin, D., Wang, D.J., Wehrli, S., Zimmerman, R.A., 2003. In vivo measurement of brain metabolites using two-dimensional double-quantum MR spectroscopy--exploration of GABA levels in a ketogenic diet. *Magn Reson Med* 49, 615-619.

- Weinschenker,D., Szot,P., 2002. The role of catecholamines in seizure susceptibility: new results using genetically engineered mice. *Pharmacol Ther* 94, 213-233.
- Whitworth,P., Heal,D.J., Kendall,D.A., 1990. The effects of acute and chronic lithium treatment on pilocarpine-stimulated phosphoinositide hydrolysis in mouse brain in vivo. *Br J Pharmacol* 101, 39-44.
- Wilder,R.M., 1921. The effect of ketonemia on the course epilepsy. *Mayo Clin Bull* 2, 307.
- Willis,S., Samala,R., Rosenberger,T.A., Borges,K., 2008. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids are not anticonvulsant or neuroprotective in acute mouse seizure models. *Epilepsia*.
- Wilong,A.A., 2007. Complications and consequences of epilepsy surgery, ketogenic diet, and vagus nerve stimulation. *Semin Pediatr Neurol* 14, 201-203.
- Wirrell,E.C., Darwish,H.Z., Williams-Dyjur,C., Blackman,M., Lange,V., 2002. Is a fast necessary when initiating the ketogenic diet? *J Child Neurol* 17, 179-182.
- Xiao,Y., Li,X., 1999. Polyunsaturated fatty acids modify mouse hippocampal neuronal excitability during excitotoxic or convulsant stimulation. *Brain Res* 846, 112-121.
- Xiao,Y.F., Gomez,A.M., Morgan,J.P., Lederer,W.J., Leaf,A., 1997. Suppression of voltage-gated L-type Ca²⁺ currents by polyunsaturated fatty acids in adult and neonatal rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4182-4187.
- Xiao,Y.F., Kang,J.X., Morgan,J.P., Leaf,A., 1995. Blocking effects of polyunsaturated fatty acids on Na⁺ channels of neonatal rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11000-11004.
- Xu,X.P., Erichsen,D., Borjesson,S.I., Dahlin,M., Amark,P., Elinder,F., 2008. Polyunsaturated fatty acids and cerebrospinal fluid from children on the ketogenic diet open a voltage-gated K channel: A putative mechanism of antiseizure action. *Epilepsy Res*.
- Yang,Q., Nagano,T., Shah,Y., Cheung,C., Ito,S., Gonzalez,F.J., 2008. The PPAR alpha-humanized mouse: a model to investigate species differences in liver toxicity mediated by PPAR alpha. *Toxicol Sci* 101, 132-139.
- Yehuda,S., Carasso,R.L., Mostofsky,D.I., 1994. Essential fatty acid preparation (SR-3) raises the seizure threshold in rats. *Eur J Pharmacol* 254, 193-198.
- Yehuda,S., Rabinovitz,S., Mostofsky,D.I., 1999. Essential fatty acids are mediators of brain biochemistry and cognitive functions. *J Neurosci Res* 56, 565-570.
- Youdim,K.A., Martin,A., Joseph,J.A., 2000. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *Int J Dev Neurosci* 18, 383-399.
- Young,C., Gean,P.W., Chiou,L.C., Shen,Y.Z., 2000. Docosahexaenoic acid inhibits synaptic transmission and epileptiform activity in the rat hippocampus. *Synapse* 37, 90-94.
- Yu,J., Ip,E., Dela,P.A., Hou,J.Y., Sessa,J., Pera,N., Hall,P., Kirsch,R., Leclercq,I., Farrell,G.C., 2006. COX-2 induction in mice with experimental nutritional steatohepatitis: Role as pro-inflammatory mediator. *Hepatology* 43, 826-836.
- Yudkoff,M., Daikhin,Y., Nissim,I., Grunstein,R., Nissim,I., 1997. Effects of ketone bodies on astrocyte amino acid metabolism. *J Neurochem* 69, 682-692.

Yudkoff,M., Daikhin,Y., Nissim,I., Horyn,O., Lazarow,A., Luhovyy,B., Wehrli,S., Nissim,I., 2005. Response of brain amino acid metabolism to ketosis. *Neurochem Int* 47, 119-128.

Yudkoff,M., Daikhin,Y., Nissim,I., Lazarow,A., Nissim,I., 2001. Brain amino acid metabolism and ketosis. *J Neurosci Res* 66, 272-281.

Yuen,A.W., Sander,J.W., Fluegel,D., Patsalos,P.N., Bell,G.S., Johnson,T., Koepp,M.J., 2005. Omega-3 fatty acid supplementation in patients with chronic epilepsy: a randomized trial. *Epilepsy Behav* 7, 253-258.

Yuhas,Y., Shulman,L., Weizman,A., Kaminsky,E., Vanichkin,A., Ashkenazi,S., 1999. Involvement of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta in enhancement of pentylenetetrazole-induced seizures caused by *Shigella dysenteriae*. *Infect Immun* 67, 1455-1460.

Ziegler,D.R., Ribeiro,L.C., Hagenn,M., Siqueira,I.R., Araujo,E., Torres,I.L., Gottfried,C., Netto,C.A., Goncalves,C.A., 2003. Ketogenic diet increases glutathione peroxidase activity in rat hippocampus. *Neurochem Res* 28, 1793-1797.