

Université de Montréal

**Études du métabolisme cérébral et musculaire lors d'une insuffisance hépatique
aiguë : Implications pour de nouvelles stratégies thérapeutiques**

Par

Nicolas Chatauret

Département de Science Biomédicales

Faculté de Médecine

**Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)
en Sciences Biomédicales**

Mai 2005

© Nicolas Chatauret



W
4
U58
2006
V.027

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Études du métabolisme cérébral et musculaire lors d'une insuffisance hépatique
aiguë : Implications pour de nouvelles stratégies thérapeutiques**

Présentée par

Nicolas Chatauret

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean Pierre Villeneuve

Dr Roger Butterworth

Dr Jane Montgomery

Dr Mary Murphy

ABRÉGÉ

L'encéphalopathie hépatique (EH) est un syndrome neuropsychiatrique apparaissant lors de maladies hépatiques chroniques et aiguës. Dans le cas d'une insuffisance hépatique aiguë (IHA), l'EH est caractérisée par des troubles neurologiques sévères. Les symptômes progressent rapidement d'un coma à la mort par engagement cérébral dû à un œdème cérébral. Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'étiologie de l'œdème cérébral lors d'une IHA ne sont pas complètement élucidés mais une toxicité de l'ammoniaque et des altérations du métabolisme cérébral (en particulier de la glutamine) sembleraient jouer un rôle clef.

Le travail présenté dans cette thèse comprend 4 articles qui ont étudié l'effet de l'IHA sur le métabolisme cérébral du glucose. Dans les articles 1 et 3, l'hypothermie a été utilisée comme un outil afin d'examiner la corrélation entre les altérations des métabolites cérébraux et la présence de l'œdème cérébral.

L'article 1 a montré que l'hypothermie retardait le développement de l'EH et prévenait l'œdème cérébral en diminuant les niveaux d'ammoniaque et de lactate dans le cerveau. Cette étude a fourni les premières indications suggérant que l'œdème cérébral et l'encéphalopathie sont la conséquence de perturbations du métabolisme énergétique cérébral, induites par l'ammoniaque.

Dans l'article 2, l'utilisation de la résonance magnétique nucléaire (RMN) au ^1H et ^{13}C a démontré que les taux et la synthèse *de novo* de lactate mais pas ceux de la glutamine, étaient corrélés avec la sévérité de l'encéphalopathie. Une réduction de la synthèse de glutamate via la voie oxydative a aussi été observée au stade du coma.

Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la synthèse du lactate et des perturbations de l'oxydation du glucose dans le cerveau plutôt qu'une accumulation de la glutamine seraient la cause principale de l'œdème cérébral lors d'une IHA.

Dans l'article 3, l'utilisation de la RMN au ^1H et ^{13}C ainsi que l'hypothermie a permis de démontrer que l'hypothermie qui prévenait pourtant l'apparition de l'œdème cérébral, n'avait pas d'effet sur les niveaux de glutamine ou sur sa synthèse *de novo* tandis qu'elle normalisait l'oxydation du glucose et la synthèse du lactate. Ces données renforcent l'hypothèse qu'un déficit du métabolisme cérébral du glucose plutôt que l'accumulation de glutamine serait à l'origine des manifestations cérébrales de l'IHA.

L'article 4 de cette thèse est centré sur la réponse de la capacité de synthèse de glutamine du cerveau et des muscles squelettiques face aux taux croissants d'ammoniaque lors d'une IHA. L'expression et l'activité enzymatique de la glutamine synthétase (GS) musculaire (uniquement) étaient augmentées lors d'une IHA menant à une élévation de la capacité de détoxification de l'ammoniaque par les muscles. Ces résultats proposent donc une base moléculaire à la capacité musculaire de détoxification de l'ammoniaque et suggèrent que le développement de composés capables de stimuler la GS musculaire (tels que l'ornithine-aspartate (OA)) pourrait se révéler être des traitements efficaces de cette maladie.

En conclusion, les résultats des 3 premiers articles viennent s'ajouter à ceux d'études cliniques non-contrôlées pour justifier la réalisation d'une étude clinique contrôlée évaluant l'effet de l'hypothermie sur l'IHA. L'article 4 fournit une base pour l'utilisation d'agents tels que l'OA lors d'une IHA.

Mots Clefs : Insuffisance hépatique aiguë, ammoniacque, Œdème cérébral, hypothermie, encéphalopathie hépatique, lactate, glutamine, glutamine synthétase, muscle squelettique.

ABSTRACT

Hepatic encephalopathy (HE) is a neuropsychiatric syndrome occurring in both acute and chronic liver diseases. In acute liver failure (ALF), HE is characterised by severe neurological symptoms which progress rapidly to coma and death generally caused by brain herniation due to brain edema. The pathophysiological mechanisms involved in the etiology of brain edema in ALF are not fully understood but ammonia toxicity and alterations of brain metabolism (in particular glutamine) are thought to play a key role.

The present thesis comprises 4 articles describing the effects of ALF due to hepatic devascularisation on brain glucose metabolism. Hypothermia was employed as a tool to investigate the relationship between brain metabolism and brain edema in ALF.

Results described in article 1 show that hypothermia results in a delay of onset of HE and prevents brain edema by decreasing brain ammonia and lactate levels. This study provides the first evidence suggesting that brain edema and encephalopathy are the consequences of ammonia-induced impairment of brain energy metabolism.

As a result of the findings described in article 1, changes in brain energy metabolism were assessed using ^1H - and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance (NMR). In article 2 it is shown that lactate (but not glutamine) levels and its *de novo* synthesis are correlated with the severity of the encephalopathy. Also the synthesis of glutamate through the oxidative pathway was shown to be reduced at coma stages of encephalopathy in ALF rats. These findings suggest that increased brain lactate

synthesis and impaired glucose oxidation rather than intracellular glutamine accumulation are the major cause of brain edema in ALF.

In article 3, hypothermia and ^1H - and ^{13}C NMR were used to assess the role of glutamine accumulation in the pathophysiology of brain edema in ALF. Hypothermia had no effect on glutamine levels or its *de novo* synthesis whereas it normalised both brain glucose oxidation and lactate synthesis. These findings further support our contention that a deficit in brain glucose metabolism rather than glutamine accumulation is the major cause of the cerebral manifestations of ALF.

Article 4 of this thesis focused on the existence of alternative mechanisms for ammonia removal, namely brain and skeletal muscle glutamine synthesis capacity in response to the increasing levels of ammonia in ALF. Muscle (but not brain) glutamine synthetase expression and enzyme activity were increased in ALF leading to an increased capacity for muscle ammonia detoxification. These findings provide a molecular basis for increased muscle ammonia detoxification in ALF and suggest that maintenance of muscle mass together with the development of agents able to stimulate muscle GS (such as L-ornithine L-aspartate (OA)) could provide effective ammonia-lowering strategies in this disorder.

In conclusions results described in the first 3 articles contribute to a growing body of evidence that hypothermia may be useful in the management of ALF and help to justify the performance of a controlled clinical trial of the effect of hypothermia in ALF. Article 4 provides evidence and a rationale for the maintenance of muscle mass (no protein restriction) and the use of agents such as OA in ALF.

Key words : Acute liver failure, Ammonia, Brain edema, Hypothermia, Hepatic encephalopathy, Lactate, Glutamine, Glutamine synthetase, Skeletal muscle.

TABLE DES MATIÈRES

ABRÉGÉ.....	I
ABSTRACT.....	IV
TABLE DES MATIÈRES.....	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	XIV
LISTE DES FIGURES	XV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XVII
REMERCIEMENTS	XX
CHAPITRE 1 REVUE DE LA LITTÉRATURE	1
1. ENCÉPHALOPATHIE HÉPATIQUE	2
<i>1.1. Définitions</i>	<i>2</i>
<i>1.2. EH chronique</i>	<i>3</i>
1.2.1. Pathogenèse	3
1.2.2. Manifestations cliniques	4
1.2.3. Neuropathologie.....	4
<i>1.3. EH aiguë.....</i>	<i>5</i>
1.3.1. Pathogenèse	5
1.3.2. Manifestations cliniques	6
1.3.3. Neuropathologie.....	6
2. MODÈLES ANIMAUX D'INSUFFISANCE HÉPATIQUE AIGUË.....	7
2.1.1. Modèles chirurgicaux.....	8
2.1.1.1. <i>Modèle d'hépatectomie.....</i>	<i>8</i>
2.1.1.2. <i>Modèle de dévascularisation hépatique</i>	<i>8</i>
2.1.2. Modèles de toxicité hépatique	10

3. PHYSIOLOGIE DE L'AMMONIAQUE	12
3.1. <i>Caractéristiques de l'ammoniaque dans les fluides biologiques</i>	12
3.2. <i>Production d'ammoniaque</i>	13
3.2.1. Production d'ammoniaque par le cerveau.....	13
3.2.2. Production d'ammoniaque par le système gastro-intestinal	14
3.2.3. Production d'ammoniaque par les reins.....	15
3.2.4. Production d'ammoniaque par le muscle.....	15
3.3. <i>Élimination de l'ammoniaque</i>	15
3.3.1. Élimination de l'ammoniaque par le foie	16
3.3.2. Élimination de l'ammoniaque par les muscles squelettiques ..	16
3.3.3. Élimination de l'ammoniaque par le cerveau	17
3.3.4. Élimination de l'ammoniaque par le colon.....	18
3.4. <i>L'ammoniaque et l'insuffisance hépatique aiguë</i>	18
4. EFFETS DE L'AMMONIAQUE SUR LA FONCTION CÉRÉBRALE	21
4.1. <i>Altérations de la neurotransmission (électrophysiologie)</i>	21
4.2. <i>Effets de l'ammoniaque sur le système glutamatergique</i>	23
4.2.1. Physiologie du système glutamatergique.....	23
4.2.1.1. Synthèse du glutamate.....	24
4.2.1.2. Récepteurs du glutamate.....	25
4.2.1.3. Transporteurs du glutamate.....	26
4.2.2. Effet de l'ammoniaque.....	27
4.2.2.1. Effets de l'ammoniaque sur les niveaux de glutamate intracellulaire.....	27
4.2.2.2. Effets de l'ammoniaque sur les niveaux de glutamate extracellulaire	28
4.2.2.3. Effets de l'ammoniaque sur les récepteurs au glutamate.....	30
4.3. <i>Effets de l'ammoniaque sur la neurotransmission GABAergique</i>	31

4.3.1. Physiologie du système GABAergique	31
4.3.2. Effets de l'ammoniaque	32
5. MÉTABOLISME DU GLUCOSE DANS LE CERVEAU	34
5.1. <i>La glycolyse</i>	35
5.2. <i>Cycle de Krebs</i>	35
5.3. <i>Synthèse d'acides aminés</i>	36
5.3.1. Alanine.....	37
5.3.2. Glutamate.....	37
5.3.3. Glutamine.....	37
5.3.4. GABA	38
5.3.5. Aspartate et N-acétyl-aspartate	38
5.4. <i>Glycolyse anaérobie (synthèse du lactate)</i>	38
5.5. <i>Bilan</i>	39
5.6. <i>Étude du métabolisme du glucose par la résonance</i> <i>magnétique nucléaire au ^1H et ^{13}C</i>	40
5.6.1. Principe	40
5.6.2. RMN au $[1-^{13}\text{C}]\text{Glucose}$	45
5.6.3. Marquage des métabolites du glucose dans le cerveau par le $[1-^{13}\text{C}]\text{Glucose}$	46
5.7. <i>Effets de l'ammoniaque sur le métabolisme énergétique</i> <i>cérébral</i>	50
6. HYPERTENSION INTRACRÂNIENNE LORS D'UNE INSUFFISANCE HÉPATIQUE AIGÜE	51
6.1. <i>Perturbations osmotiques cérébrales lors d'une IHA</i>	52
6.2. <i>Débit sanguin cérébral lors d'une IHA</i>	53
7. TRAITEMENTS DE L'INSUFFISANCE HÉPATIQUE AIGÜE	55
7.1. <i>Stratégies de réduction de l'hyperammoniémie</i>	55
7.1.1. Le lactulose, les acides aminés à chaîne latérale ramifiée et les antibiotiques non-absorbables	56

7.1.2. La L-Ornithine L-Aspartate	56
7.2. Réduction de l'œdème cérébral.....	56
7.2.1. Solutions hypertoniques.....	56
7.2.2. Antagoniste des récepteurs NMDA	57
7.2.3. Anticonvulsant	57
7.3. Action sur le DSC et le métabolisme.....	58
7.3.1. L'hyperventilation	58
7.3.2. La N-acétylcystéine	58
7.3.3. L'indométhacine	59
7.4. Réponse inflammatoire systémique.....	59
7.4.1. La dexaméthasone.....	59
7.4.2. L'hépatectomie	59
7.5. Action sur plusieurs voies métaboliques, l'hypothermie	60
8. BUT DES ÉTUDES.....	61

**CHAPITRE 2 ÉTUDES DU MÉTABOLISME CÉRÉBRAL ET
MUSCULAIRE LORS D'UNE INSUFFISANCE HÉPATIQUE AIGÜE :
IMPLICATIONS POUR DE NOUVELLES STRATÉGIES
THÉRAPEUTIQUES.....63**

1. ARTICLE 1: MILD HYPOTHERMIA PREVENTS CEREBRAL EDEMA AND CSF LACTATE ACCUMULATION IN ACUTE LIVER FAILURE.	64
2. ARTICLE 2: SELECTIVE INCREASE OF BRAIN LACTATE SYNTHESIS IN EXPERIMENTAL ACUTE LIVER FAILURE: RESULTS OF A [¹ H- ¹³ C] NMR STUDY.....	81
3. ARTICLE 3: EFFECTS OF MILD HYPOTHERMIA ON BRAIN GLUCOSE METABOLISM IN ACUTE LIVER FAILURE: ¹ H/ ¹³ C-NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE STUDY.	112
4. ARTICLE 4 : DIRECT MOLECULAR AND SPECTROSCOPIC EVIDENCE FOR INCREASED AMMONIA REMOVAL CAPACITY OF SKELETAL MUSCLE IN ACUTE LIVER FAILURE.....	144

CHAPITRE 3 DISCUSSION GÉNÉRALE164

1. MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE CÉRÉBRAL LORS D'UNE INSUFFISANCE HÉPATIQUE AIGUË.....	165
1.1. <i>Élévation des niveaux de lactate cérébral lors d'une IHA...</i>	165
1.2. <i>Origine des taux élevés de lactate cérébral lors d'une IHA</i>	166
1.2.1. Présence d'une hypoxie cérébrale (déficit en ATP) lors d'une IHA.....	166
1.2.2. Augmentation du transport du lactate au travers de la barrière hémato-encéphalique lors d'une IHA	168
1.2.3. Augmentation de la synthèse intracérébrale de lactate lors d'une IHA	170
1.2.3.1. <i>Activation de la glycolyse lors d'une hyperammoniémie</i>	171
1.2.3.2. <i>Inhibition de la navette malate-aspartate lors d'une hyperammoniémie</i>	172
1.2.3.3. <i>Perturbations du cycle de Krebs lors d'une hyperammoniémie</i>	174
1.2.3.4. <i>Maintien des niveaux d'ATP lors d'une IHA.....</i>	176
2. SYNTHÈSE DES ACIDES AMINÉS LORS D'UNE INSUFFISANCE HÉPATIQUE AIGUË.....	179
2.1. <i>Effet sur la synthèse de l'alanine.....</i>	179
2.1.1. Augmentation du transport de l'alanine au travers de la BHE	180
2.1.2. Augmentation de la synthèse intracérébrale d'alanine	180
2.2. <i>Effet sur la synthèse de la glutamine</i>	181
2.2.1. Augmentation du transport de la glutamine au travers de la BHE.....	182
2.2.2. Augmentation de la synthèse intracérébrale de glutamine	182
2.2.2.1. <i>Détoxication de l'ammoniaque.....</i>	183
2.2.2.2. <i>Augmentation de la transformation du glutamate en glutamine.....</i>	184

2.2.2.3. <i>Inhibition de la transformation de la glutamine en glutamate</i>	184
2.2.2.4. <i>Adaptabilité de la synthèse cérébrale de glutamine lors de l'IHA</i>	185
2.3. <i>Effet sur la synthèse du glutamate</i>	186
2.4. <i>Effet sur la synthèse du NAA</i>	188
2.5. <i>Effet sur la synthèse du GABA</i>	188
3. CONSÉQUENCES CÉRÉBRALES DES ALTÉRATIONS DU MÉTABOLISME DU GLUCOSE LORS D'UNE IHA ET EFFET DE L'HYPOTHERMIE	189
3.1. <i>Perturbations osmotiques lors d'une IHA</i>	190
3.1.1. Rôle joué par l'accumulation intracellulaire de la glutamine	190
3.1.2. Rôle joué par l'accumulation de lactate et d'alanine.....	193
3.1.3. Rôle joué par l'acidose lactique.....	194
3.2. <i>Augmentation du débit sanguin cérébral lors d'une IHA</i>	197
3.2.1. Rôle du lactate	197
3.2.2. Rôle de la glutamine	197
3.2.3. Rôle du glutamate extracellulaire	198
4. DÉTOXICATION DE L'AMMONIAQUE PAR LE CERVEAU ET LES MUSCLES SQUELETTIQUES LORS D'UNE IHA	200
4.1. <i>Métabolisme musculaire de l'ammoniaque</i>	201
4.1.1. Expression et activité de la GS musculaire.....	201
4.1.2. Production musculaire de glutamine.....	203
4.1.3. Élimination de l'ammoniaque par le muscle.	204
4.1.4. Production de glutamine comme moyen de détoxification de l'ammoniaque.....	205
4.2. <i>Métabolisme cérébral de l'ammoniaque</i>	206
CHAPITRE 4 CONCLUSIONS	209
CHAPITRE 5 RÉSUMÉ	213

1. EFFET DE L'AMMONIAQUE SUR LE MÉTABOLISME CÉRÉBRAL....	214
2. CONSÉQUENCES NEUROLOGIQUES DES ALTÉRATIONS DU MÉTABOLISME CÉRÉBRAL.....	217
3. EFFETS DE L'HYPOTHERMIE.....	219
4. ADAPTABILITÉ DE L'ORGANISME FACE À L'IHA ET L'HYPERAMMONIÉMIE.....	220
5. ÉTUDES FUTURES:	222
BIBLIOGRAPHIE.....	224

LISTE DES TABLEAUX

Article 1:

Table 1: Plasma and CSF Ammonia in ALF.....72

Table 2: Brain Water Content.72

Article 2:

Table 1: Concentration and fractional ^{13}C -enrichment in plasma $[1-^{13}\text{C}]$ glucose.90

Table 2: Concentrations of plasma and brain metabolites.92

Article 3:

Table 1: Plasma and CSF ammonia and brain water content in ALF rats.123

Article 4:

Table 1: Arterial plasma levels, A-V differences, muscle ammonia and glutamine fluxes, and hemodynamics in the hindlimb of rats with acute liver failure compared to sham-operated controls.....156

Chapitre 3:

Tableau 1: Niveau d'ATP cérébral dans différents modèles expérimentaux d'insuffisance hépatique aiguë.....167

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1:

Figure 1: Schéma simplifié représentatif de la neurotransmission glutamatergique dans le cerveau.	24
Figure 2: Destinées principales du glucose dans le cerveau.....	39
Figure 3: Principes de bases de la résonance magnétique nucléaire.	41
Figure 4: Principe de la transformation de Fourier et du décalage chimique.....	43
Figure 5: Effet du couplage J sur le déplacement chimique.....	45
Figure 6: Distribution du marquage des métabolites du [1- ¹³ C]glucose dans le cerveau.....	48
Figure 7: Spectre typique de ¹³ C RMN d'extrait de cerveau de rat.....	49

Chapitre 2:

Article 1:

Figure 1: Prevention of the increase in CSF lactate by mild hypothermia in rats with ALF due to hepatic devascularization.	73
--	----

Article 2:

Figure 1: ¹ H-NMR spectra of brain extracts.....	91
Figure 2: Metabolic fate of ¹³ C-label from 1- ¹³ C-glucose.....	93
Figure 3: Concentrations and ¹³ C-enrichments of lactate.....	95
Figure 4: ¹³ C-NMR spectra of brain extracts.	96
Figure 5: ¹³ C-label incorporation into alanine, glutamate and glutamine.	97
Figure 6: Relative contribution of flux through PDH versus PC.	99

Article 3:

Figure 1: Labeling of metabolites from [1- ¹³ C]glucose: label distribution in glycolytic and TCA cycle intermediates during metabolism of [1- ¹³ C]glucose.	122
Figure 2: ¹ H-NMR spectra of brain extracts in ALF: effect of hypothermia.	124

Figure 3: Concentrations of brain amino acids in ALF: effect of hypothermia.	125
Figure 4: Brain lactate synthesis in ALF: effect of hypothermia.	126
Figure 5: ^{13}C -NMR Spectra of brain extracts from rats with ALF: effect of hypothermia.	128
Figure 6: Brain alanine synthesis in ALF: effect of hypothermia.	129
Figure 7: Synthesis of brain glutamate and glutamine in ALF: effect of hypothermia.	130
Figure 8: Relative contribution of carbon flux through PDH and PC:.....	131

Article 4:

Figure 1: GS protein and enzyme activities in brain (cerebral cortex) and skeletal muscle of rats with ALF.	155
Figure 2: Muscle glutamine concentrations and <i>de novo</i> synthesis from [U- ^{13}C]-glucose, in rats with ALF compared to sham-operated controls measured by $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR.	158
Figure 3: Schematic representation of the glutamine synthesis reaction in muscle and brain.	159

Chapitre 3:

Figure 1 : Représentation schématique de la navette malate-aspartate.	173
---	-----

Chapitre 5:

Figure 1: Mécanismes impliqués dans les changements du métabolisme énergétique et du métabolisme du glucose lors d'une IHA.	215
Figure 2: Conséquences potentielles des altérations du métabolisme cérébral du glucose par l'IHA.	218
Figure 3: Adaptabilité de la capacité de synthèse de glutamine des muscles squelettiques et du cerveau lors d'une hyperammoniémie due à une IHA.	221

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α -KG : α -cétoglutarate

ALAT : Alanine Aminotransférase

AMP : Adénosine monophosphate

AMPA : Acide α -amino-3-hydroxy-5 méthylisoxazole-4-propionique

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

Asp : Aspartate

Asp-AT : Aspartate aminotransférase

ATP : Adénosine triphosphate

A-V : Arterio-veineux

Ca²⁺ : Ion calcium

cAAT : Aspartate aminotransférase cytosolique

CCl₄ : Tétrachlorure de carbone

Cl⁻ : Ion chlore

cMDH : Malate déshydrogénase cytosolique

DSC : Débit sanguin cérébral

EH : Encéphalopathie hépatique

GABA : Acide γ -aminobutyrique

GFAP : « Glial Fibrillary Acid Protein » protéine glio-fibrillaire acide

Gln : Glutamine

GS : Glutamine synthétase

H⁺ : Proton

IBP : Carboxamide d'isoquinoline

IHA : insuffisance hépatique

K^+ : Ion potassium

KA : Kainate

KGDH : α -cétoglutarate déshydrogénase

Lac : Lactate

LAH : Ligature de l'artère hépatique

LCR : Liquide céphalorachidien

LDH : Lactate déshydrogénase

mAAT : Aspartate aminotransférase mitochondriale

mMDH : Malate déshydrogénase mitochondriale

Na^+ : Ion sodium

NH_3 : Ammoniaque

NH_4^+ : Ion ammonium

NMDA : N-méthyl-D-Aspartate

OA : L-ornithine L-aspartate

OAA : Oxaloacétate

PAG : Glutaminase activée par le phosphate

PC : Pyruvate carboxylase

PCA : Anastomose portocave

PDH : Pyruvate déshydrogénase

PIC : Pression intracrânienne

PTBR : Récepteur aux benzodiazépines de type périphérique

RMN : Résonance magnétique nucléaire

SNC : Système nerveux central

TAA : Thioacétamide

TGA : Transporteur Glutamate Aspartate

TIPSS : Shunt portosystémique intra-hépatique transjugulaire

TMA : Transporteur Malate- α -cétoglutarate

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier Roger Butterworth pour m'avoir guidé et supporté durant toutes les années qui m'ont été nécessaires afin que je puisse compléter ce travail, mais je le remercie surtout de m'avoir enseigné une façon très non-européenne de diriger un laboratoire de recherche et aussi de m'avoir démontré que le meilleur endroit pour parler « Science » n'est pas le labo, mais plutôt une plage en Espagne, au cours d'une randonnée en montagne ou sur un « chair-lift » pendant le ski de printemps. Ce sont des leçons que je compte bien appliquer si un jour je dirige mon propre laboratoire.

Je sais que Paul Desjardins n'aime pas les longs discours, alors Paul je vais juste te dire merci pour tout, et en particulier pour ne m'avoir jamais rien dit lorsque j'ai fait toutes les erreurs possibles et imaginables quand tu m'enseignais la PCR ou les western blots.

Je voudrais remercier tous les étudiants du laboratoire pour m'avoir offert l'opportunité de collaborer avec eux et pour m'avoir permis de publier autant. Je tiens à remercier en particulier Claudia Zwingmann, Mireille Bélanger, Javier Vaquero et Chris Rose. Thanks Claudia for introducing me to the impossible to understand science of NMR.

Merci Mireille pour t'être tapée le pavé à lire (comme on dit chez moi), en espérant que tu ne te seras pas trop ennuyée en lisant cette thèse.

Javier gracias para todo, y en particular para animarme en los tiempos mas dificiles de mi vida. Si necesitas alguien para hacerte PCA en Madrid, llamame y estaré. Nos veremos alli.

Also, I thank you and Mireille for playing outdoor hockey with me, I am sure with a couple of years more I would have been able to play for real (or even I would have made the french team), or at least I would have been able to learn how to stop.

Finally I would like to thank Chris, for pushing me to come back to Montreal to do a Master and for everything he did for me in the lab and especially outside the lab.

Je voudrais remercier toutes les personnes du centre de recherche pour avoir si bien accueilli un autre « maudit » français et pour ne pas m'avoir trop charrié/niaisé avec ça., et aussi toutes les personnes en dehors du labo qui ont rendu mes années au Canada inoubliables. Le Canada me manquera beaucoup (à par peut être les maringouins).

Enfin, je voudrais remercier ma famille et en particulier mes parents et grands-parents pour m'avoir soutenu (moralement et avec pas mal de francs et d'euros) toutes ces années ce qui m'a permis de découvrir et de profiter autant du Canada.

CHAPITRE 1
REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. ENCÉPHALOPATHIE HÉPATIQUE

1.1. Définitions

L'encéphalopathie hépatique (EH) est un syndrome neuropsychiatrique complexe qui survient lors d'une insuffisance hépatique. L'insuffisance hépatique peut être causée par des maladies hépatiques chroniques ou aiguës (exemple : hépatites virales), des erreurs héréditaires du cycle de l'urée et par l'apparition spontanée ou la réalisation chirurgicale d'un shunt veineux porto-systémique (une anastomose portocave (PCA) ou un shunt porto-systémique intrahépatique transjugulaire (TIPSS)) visant à réduire l'hypertension portale induite par la dysfonction hépatique. L'EH se présente sous deux formes (aiguë ou chronique) dépendamment de la vitesse de développement et de l'étendue des lésions hépatiques ainsi que du degré de shunt porto-systémique et de la présence d'un facteur de précipitation. L'EH est classifiée comme étant une encéphalopathie métabolique réversible après traitement chirurgical.

Malgré des années de recherche scientifique, les causes précises de l'EH sont encore inconnues, mais il a été avancé que des neurotoxines sanguines (exemple : l'ammoniaque) et les astrocytes joueraient un rôle clef (Butterworth., 2003).

Cette thèse est consacrée à l'étude de la forme aiguë alors la forme chronique de l'EH ne sera présentée que sommairement.

1.2. EH chronique

L'EH chronique qui est aussi appelée encéphalopathie porto-systémique est associée à une augmentation du shunt porto-systémique du sang chargé de toxines provenant des intestins et qui apparaît suite à une dysfonction hépatique chronique.

1.2.1. Pathogenèse

L'origine de l'insuffisance hépatique est variée mais elle est le plus souvent causée par des hépatites virales B ou C et par une cirrhose alcoolique. Le foie étant le principal organe responsable de l'élimination des toxines endogènes et exogènes, le shunt porto-systémique va alors diminuer la quantité de sang traitée par le foie. Les toxines provenant principalement des intestins ne seront plus éliminées et vont pouvoir atteindre le cerveau où elles vont s'accumuler pour atteindre des concentrations qui vont être à l'origine des dysfonctions neurologiques observées lors de l'EH. Dans le cas d'une EH chronique, il a été avancé que deux de ces substances seraient l'ammoniaque et le manganèse.

Des niveaux d'ammoniaque plasmatique de 0.06-0.07mM ont été rapportés chez des patients ayant une EH moyenne (Lockwood et coll., 1991b). Cette augmentation des niveaux plasmatiques d'ammoniaque s'accompagne aussi d'une augmentation de 3 à 4 fois du rapport entre la concentration d'ammoniaque dans le cerveau et la concentration dans le sang, rapport qui dans les conditions normales est de 2 (Cooper et Plum., 1987).

1.2.2. Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques de l'EH chronique s'étendent de changements subtils de la fonction cérébrale, détectables seulement à l'aide de tests psychométriques, jusqu'à un coma profond. L'EH peut être présente chez 50-70% des patients ayant une cirrhose, ce qui inclue aussi les patients dont les troubles neurologiques ont été détectés par des tests psychométriques (Gitlin et coll., 1986). La mort en coma hépatique est fréquente chez les patients atteints d'une cirrhose et d'une insuffisance hépatique avancée mais, contrairement à l'encéphalopathie hépatique aiguë, la forme chronique n'est généralement pas associée à un œdème cérébral et à une hypertension intracrânienne. Cependant l'utilisation de technique d'imagerie en résonance magnétique (rapport de transfert de magnétisation) a permis de suggérer qu'il y aurait un œdème cérébral léger dans certaines régions du cerveau lors d'une cirrhose (Rovira et coll., 2002).

1.2.3. Neuropathologie

Au niveau neuropathologique, les formes chroniques et aiguës de l'EH sont caractérisées par des changements astrocytaires plutôt que neuronaux et elles ne sont pas associées à une mort neuronale.

La forme chronique d'EH, est associée à des changements de la morphologie et de la fonction astrocytaire. Un gonflement des astrocytes peut être présent mais il n'est généralement pas suffisant pour causer des altérations de la pression intracrânienne. Les changements morphologiques typiques rencontrés lors d'une insuffisance hépatique chronique sont connus sous le nom d'astrocytose d'Alzheimer de type II, où les astrocytes présentent un gros noyau gonflé, un nucléole proéminent,

et une marginalisation de la chromatine (Butterworth et coll., 1987; Norenberg., 1988). L'exposition d'astrocytes en culture à des concentrations d'ammoniaque équivalentes à celles retrouvées lors d'une insuffisance hépatique chronique induit des changements morphologiques identiques à l'astrocytose d'Alzheimer de type II (Gregorios et coll., 1985). Cette observation a permis de suggérer que l'ammoniaque joue un rôle déterminant dans la neuropathologie observée lors d'une insuffisance hépatique chronique.

1.3. EH aiguë

La forme aiguë de l'encéphalopathie est associée à une insuffisance hépatique aiguë (IHA).

1.3.1. Pathogenèse

L'IHA est le plus souvent induite par une surdose de substances hépatotoxiques telle que l'acétaminophène, par des hépatites fulminantes (A, B et C), par des toxines, et aussi par certains champignons et plantes médicinales. Son développement est rapide.

Les niveaux plasmatiques d'ammoniaque atteignent 0.1-0.45 mM lors d'une IHA chez l'humain (Clemmesen et coll., 1999) et il a été rapporté que les concentrations d'ammoniaque peuvent être jusqu'à 8 fois plus élevées dans le cerveau que dans le plasma lors d'une IHA expérimentale (Cooper et Plum., 1987). Récemment il a été avancé que l'EH aiguë pourrait être précipitée par des facteurs en plus de l'ammoniaque comme l'inflammation et certaines cytokines provenant du foie nécrotique (Vaquero et coll., 2003).

1.3.2. Manifestations cliniques

L'insuffisance hépatique aiguë conduit invariablement à des dysfonctions sévères du système nerveux central qui progressent en quelques heures voire quelques jours, d'une altération de l'état mental à un coma et des convulsions puis la mort. Les taux de mortalité atteignent 90% sans transplantation hépatique. La principale cause de mortalité de l'IHA est un engagement cérébral causé par une augmentation de la pression intracrânienne qui fait suite à un œdème cérébral. L'apparition de l'engagement cérébral est corrélée avec l'augmentation des taux artériels d'ammoniaque (Clemmesen et coll., 1999).

1.3.3. Neuropathologie

Tout comme dans le cas de l'EH chronique, il n'y a pas de mort neuronale lors d'une IHA. L'IHA est caractérisée par un œdème cérébral cytotoxique et les astrocytes sont les cellules qui présentent un gonflement significatif (Traber et coll., 1987; Kato et coll., 1992). Le gonflement des astrocytes empire avec la progression de l'insuffisance hépatique. Il est vraisemblablement à l'origine de l'œdème cérébral observé au stade de coma de l'IHA qui va être responsable de la mort par engagement cérébral. La forte corrélation entre l'engagement cérébral et les taux artériels d'ammoniaque suggère que l'ammoniaque joue un rôle prédominant dans la pathogenèse de l'œdème cérébral (gonflement des astrocytes) lors d'une IHA. De plus, la présence d'un œdème cérébral dans d'autres syndromes hyperammonémiques tels que le syndrome de Reye et des enzymopathies congénitales du cycle de l'urée supportent l'implication de l'ammoniaque dans le gonflement des astrocytes. Dans ces syndromes, les concentrations artérielles

d'ammoniaque peuvent atteindre 1 mM (Kendall et coll., 1983; Butterworth., 1998a). Aussi, l'exposition de cultures d'astrocytes à des concentrations millimolaires d'ammoniaque induit leur gonflement (Norenberg., 1988). On peut donc dire que dans l'IHA la neuropathologie est en accord avec une exposition des cellules à l'ammoniaque.

Les astrocytes sont les cellules les plus abondantes formant le cerveau, le rapport astrocyte/neurone atteint 10/1. Les astrocytes occupent un tiers du volume du cortex cérébral (Pope., 1978). Du fait du nombre important d'astrocytes dans le cerveau, l'œdème astrocytaire observé lors d'une IHA pourrait être suffisant pour expliquer l'œdème cérébral. Cette affirmation n'a cependant jamais pu être vérifiée car d'autres facteurs influençant le développement de l'œdème cérébral (changements hémodynamiques) sont aussi présents lors d'une IHA (Blei., 2005).

2. MODÈLES ANIMAUX D'INSUFFISANCE HÉPATIQUE AIGÜE

Il existe plusieurs modèles animaux d'IHA réalisés dans différentes espèces comme le rat, la souris, le lapin, le chien et le porc. Ces différents modèles ont été revus en partie par Newsome et al. en 2000 et sont tous basés soit sur des techniques chirurgicales, soit sur l'administration de toxines hépatiques spécifiques. La plupart de ces modèles présentent une ou plusieurs caractéristiques de l'IHA humaine, c'est-à-dire une hyperammoniémie, des troubles neurologiques et la présence d'un œdème cérébral aux stades terminaux de l'encéphalopathie.

2.1.1. Modèles chirurgicaux

Les modèles chirurgicaux s'appuient sur l'élimination de la fonction hépatique en enlevant complètement le foie (modèle d'hépatectomie) ou en supprimant l'apport de sang au foie (modèle de dévascularisation hépatique).

2.1.1.1. Modèle d'hépatectomie

Ce modèle est appliqué chez différentes espèces animales telles que le rat (Olafsson et coll., 1995), le lapin (Nyberg et coll., 1996), le chien (Baba et coll., 1994) et le porc (Lempinen et coll., 1973). Cette procédure se fait généralement en deux étapes (réalisation d'une anastomose portocave suivie, 24h plus tard, de l'hépatectomie) afin de réduire le traumatisme chirurgical. Récemment, une nouvelle technique, peu traumatique, d'hépatectomie en une étape a été développée (Filipponi et coll., 1999). Bien que les animaux présentent un coma, un désavantage de l'utilisation de ce modèle est l'absence de cellules hépatiques endommagées ou nécrotiques dans la circulation sanguine qui est une caractéristique importante de la pathologie humaine dans laquelle le foie est toujours perfusé et libère des substances toxiques dans la circulation.

2.1.1.2. Modèle de dévascularisation hépatique

Ce modèle est basé sur la réalisation d'une anastomose portocave suivie d'une ligature de l'artère hépatique. Cette procédure peut être réalisée chez le rat (Zaki et coll., 1984), le lapin (de Knecht et coll., 1994a) ou le porc (Ytrebo et coll., 2001).

Dans cette thèse, nous avons utilisé cette technique chez le rat pour induire une insuffisance hépatique aiguë. Les rats ont été anesthésiés avec de l'isoflurane et

une anastomose portocave a été réalisée selon la technique décrite par Lee et Fischer (Lee et Fisher., 1961). 24 heures après la réalisation de l'anastomose portocave, une nouvelle laparotomie a été réalisée et l'artère hépatique a été ligaturée. Dans ce modèle, les concentrations plasmatiques d'ammoniaque atteignent 1mM au stade du coma et les concentrations cérébrales peuvent atteindre des niveaux de 1 à 5 mM (Swain et coll., 1992a).

L'encéphalopathie se développe rapidement et on distingue deux troubles neurologiques typiques qui sont le précoma et le coma. Le précoma est défini par une perte du réflexe de redressement, alors que le coma est quant à lui défini par une perte du réflexe de redressement accompagnée d'une perte du réflexe cornéen. En général, le stade de précoma survient 8-10 heures après la ligature de l'artère hépatique et le coma survient 12-15 heures après la ligature.

La dévascularisation hépatique a pour conséquence d'induire une hypothermie et une hypoglycémie sévère qui peuvent toutes les deux interférer avec le statut neurologique des animaux, c'est pourquoi la température corporelle des animaux est maintenue à 37 °C à l'aide de couvertures chauffantes et que la glycémie est maintenue à des valeurs normales par l'injection périodique d'une solution de dextrose 5% dans l'eau, par voie sous cutanée.

Contrairement au modèle d'hépatectomie, ce modèle semble présenter l'avantage que malgré que le foie ne soit pas perfusé, on retrouve dans la circulation sanguine des substances produites par le foie nécrotique (Tonnesen., 1977).

2.1.2. Modèles de toxicité hépatique

Il existe plusieurs toxines hépatiques comme le tétrachlorure de carbone, la thioacétamide, la galactosamine, l'azoxyméthane et l'acétaminophène. Elles sont utilisées chez le lapin, le rat, la souris, le chien et le porc selon leur efficacité dans chaque espèce.

La galactosamine est préférentiellement utilisée chez le lapin (Traber et coll., 1987), le rat (Li et coll., 2004), le chien (Nyberg et coll., 1998) et le porc (Kalpana et coll., 1999). C'est une toxine hépatique sélective qui est métabolisée par la voie du galactose dans le foie. Elle conduit à une déplétion de l'uridine intracellulaire qui va entraîner une perturbation du métabolisme de l'ARN dans les hépatocytes, ce qui va induire une nécrose de ces cellules (Newsome et coll., 2000).

L'acétaminophène est utilisé chez la souris (Fiorucci et coll., 2004), le rat (Bates et coll., 1988), le lapin (Rahman et coll., 2004), le chien (Francavilla et coll., 1989) et le porc (Miller et coll., 1976). Lors d'une surdose d'acétaminophène, le cytochrome P450 devient sa voie principale de détoxification et conduit à la formation d'un composé toxique, le N-acétyl parabenzoquinonéimine (NAPQI). Le glutathion est utilisé pour détoxifier ce composé. Lors d'une surdose, les niveaux de glutathion vont s'épuiser et le NAPQI va causer une nécrose hépatique centrilobulaire (Newsome et coll., 2000). Bien que ce modèle de toxicité hépatique soit très pertinent pour modéliser la surdose d'acétaminophène chez l'humain, il existe plusieurs problèmes associés à l'utilisation de ce composé chez les animaux. Le premier est que la reproductibilité est souvent faible et le deuxième réside dans le fait que l'acétaminophène a, à fortes doses, des effets extra-hépatiques incluant l'induction d'une méthémoglobinémie (Newsome et coll., 2000).

Le tétrachlorure de carbone (CCl_4) est utilisé chez la souris (Mei et coll., 1993) et le rat (Bates et coll., 1988; Taniguchi et coll., 2004). La toxicité du CCl_4 est médiée par la génération du radical libre trichlorométhyle qui est hautement réactif et qui conduit à la peroxydation des lipides cellulaires, des protéines et de l'ADN (Bates et coll., 1989). Cette peroxydation va être à l'origine des dommages hépatiques.

La thioacétamide (TAA) est utilisée chez la souris (Itzhak et coll., 1995) et le rat (Albrecht et coll., 1985). La TAA est un composé thiono-sulfaté qui possède une activité cancérigène et hépatotoxique. Après avoir été administrée la TAA est transformée en thioacétamide-S-oxyde. La TAA et la TAA-S-oxyde qui vont être toutes les deux, rapidement métabolisés par le cytochrome P450. Les métabolites qui sont alors générés, tels que le sulfène et le thioacétamide-S-oxyde sont responsables de la mort cellulaire des hépatocytes (Wang et coll., 2004).

L'azoxyméthane est contenu dans une noix de l'île de Guam qui est parfois à l'origine de dommages hépatiques chez l'homme et chez les animaux de ferme. L'azoxyméthane, est un composé cancérigène qui est utilisé à forte dose chez la souris pour induire une IHA (Matkowskyj et coll., 1999). L'azoxyméthane cause une nécrose hépatique centrilobulaire en exerçant possiblement une toxicité au niveau des mitochondries hépatiques (Matkowskyj et coll., 1999).

Les modèles basés sur l'utilisation de ces toxines présentent l'avantage d'induire une IHA qui implique une nécrose hépatique et la libération dans la circulation sanguine de facteurs de nécrose et de facteurs médiant l'inflammation de manière similaire à la pathologie humaine. Cependant, chaque composé possède des désavantages. Les modèles au CCl_4 et à l'acétaminophène sont peu reproductibles et

on observe des variations dans la réponse entre les individus d'une même espèce. La galactosamine n'a aucun équivalent chez l'humain et il y a une grande variabilité d'efficacité entre les lots de galactosamine. La molécule la plus prometteuse semble être l'azoxyméthane, cependant cette molécule n'a été testée que chez les souris, dont la taille limite la réalisation de certaines expériences (Matkowskyj et coll., 1999).

3. PHYSIOLOGIE DE L'AMMONIAQUE

L'ammoniaque semble être un des facteurs déterminants impliqués dans l'apparition de l'encéphalopathie. Dans des conditions normales, l'ammoniaque est produit soit de façon endogène au cours de réactions métaboliques ou soit par l'action d'enzymes catabolisantes sur des composés exogènes.

3.1. Caractéristiques de l'ammoniaque dans les fluides biologiques

Dans des solutions aqueuses, l'ammoniaque (NH_3) est en équilibre avec l'ion ammonium (NH_4^+). Le pKa de l'ammoniaque, calculé à partir de l'équation de Henderson-Hasselbach dans le sang à 37°C, est de 9.1-9.2 (Cooper et Plum., 1987). Dans des conditions physiologiques normales, 98-99% de l'ammoniaque est donc présent sous la forme de l'ion ammonium. Le NH_3 est beaucoup plus soluble dans l'eau et les lipides que le CO_2 et il est considérablement plus soluble dans le plasma que dans l'eau, sûrement du fait de sa lipophilie (Cooper et Plum., 1987). Le NH_3 (lipophile) diffuse facilement au travers des membranes plasmiques tandis que les ions NH_4^+ (hydrophiles) traversent la membrane plasmique en empruntant les canaux potassiques (Raichle et Larson., 1981). Le NH_4^+ a une perméabilité de 0.3 fois celle

du potassium (Binstock et Lecar., 1969) et peut donc passer la barrière hémato-encéphalique via les canaux potassiques. En résumé, l'ammoniaque peut donc passer la barrière hémato-encéphalique de deux façons distinctes selon la forme ionique sous laquelle il se trouve. Sous forme gazeuse (NH_3), il entrera par diffusion. Sous forme ionique (NH_4^+), il pourra emprunter les canaux potassiques pour traverser la membrane plasmique.

3.2. Production d'ammoniaque

3.2.1. Production d'ammoniaque par le cerveau

L'ammoniaque est un produit généré par au moins 16 réactions enzymatiques impliquées dans le métabolisme cérébral normal. Les trois principales responsables de la majorité de la production d'ammoniaque par le cerveau sont : (1) la glutaminase, (2) la glutamate déshydrogénase et (3) le cycle des nucléotides puriniques dans lequel la glutamine, le glutamate et l'aspartate vont être la source d'une production d'ammoniaque (Cooper et Plum., 1987).

(1) La glutaminase est aussi appelée glutaminase activée par le phosphate (PAG) ou glutaminase phosphodépendante pour la distinguer de la glutaminase activée par le maléate qui se trouve dans les reins. L'activité glutaminase se retrouve dans tout le cerveau et elle est particulièrement abondante dans la fraction synaptosomale. Elle catalyse la conversion de la glutamine en glutamate plus ammoniaque.

(2) La glutamate déshydrogénase est une enzyme de la mitochondrie qui catalyse la désamination oxydative réversible du glutamate qui conduit à la

production d' α -cétoglutarate et d'ammoniaque (voir paragraphe 5.3.2 du chapitre 1). Il a été montré que le glutamate peut être la source de 35 à 50% de l'ammoniaque produit par des coupes de cerveau *in vitro* (Takagaki et coll., 1957; Weil-Malherbe et Gordon., 1971). La réaction de la glutamate déshydrogénase est thermodynamiquement fortement en faveur de la formation de glutamate mais est facilement réversible et donc le flux net d'ammoniaque dépend de l'état métabolique de la mitochondrie (Cooper et Plum., 1987).

(3) Le cycle des nucléotides puriniques serait responsable d'une synthèse d'ammoniaque dans le cerveau mais aussi dans les muscles squelettiques ainsi que dans d'autres tissus. Le bilan de ce cycle est que l'aspartate est transformé en fumarate plus de l'ammoniaque à l'aide de l'hydrolyse d'une molécule de GTP (Cooper et Plum., 1987).

3.2.2. Production d'ammoniaque par le système gastro-intestinal

Chez une personne saine, l'ammoniaque est généré en grande quantité dans les intestins. Les intestins ont une forte activité glutaminase qui est localisée principalement dans les entérocytes. Des études post-prandiales, chez des chiens sains, ont estimé que la consommation/métabolisme de la glutamine représentait 50% de la quantité totale d'ammoniaque produite par les viscères drainés par la veine porte (Weber, Jr. et Veach., 1979). Les 50% restants sont produits par le colon, et dérivent en majeure partie de la capture, à partir du sang artériel, de l'urée qui est utilisée par l'uréase contenue dans la flore bactérienne. Aussi, *Helicobacter Pylori* qui est la bactérie responsable des ulcères d'estomac, possède une très forte activité uréase et

des amidases aliphatiques qui sont capables de produire de grandes quantités d'ammoniaque (Bury-Mone et coll., 2003). Cette bactérie est donc un facteur de précipitation potentiel de l'EH.

3.2.3. Production d'ammoniaque par les reins

Le rein exprime la glutaminase et est capable de produire de l'ammoniaque. Dans des conditions physiologiques normales, les reins produisent de l'ammoniaque dont 70% est libéré dans la veine rénale et le reste est excrété dans l'urine.

3.2.4. Production d'ammoniaque par le muscle

Comme il a été mentionné dans le paragraphe 3.2.1 de ce chapitre, les muscles squelettiques produisent de l'ammoniaque via le cycle des nucléotides puriniques. Cette production est particulièrement importante pendant et à la suite d'exercices vigoureux (Babij et coll., 1983; Terjung et coll., 1985).

3.3. Élimination de l'ammoniaque

L'ammoniaque est toxique lorsqu'il est présent à fortes concentrations, et dans les conditions physiologiques normales, il est rapidement détoxiqué et les concentrations artérielles sont maintenues à des niveaux faibles (50-100 μM). Cette détoxification a lieu principalement au niveau du foie, mais le cerveau et les muscles squelettiques sont aussi capables d'éliminer l'ammoniaque. Contrairement au cerveau et aux muscles squelettiques qui ne possèdent que la synthèse de glutamine pour éliminer l'ammoniaque, le foie s'appuie à la fois sur la synthèse d'urée et sur la synthèse de la glutamine pour détoxiquer l'ammoniaque. Le foie est le seul organe possédant un cycle de l'urée fonctionnel.

3.3.1. Élimination de l'ammoniaque par le foie

La détoxification de l'ammoniaque par le foie est très compartimentée. L'ammoniaque est éliminé au niveau de deux sites distincts mais métaboliquement apparentés. L'urée est synthétisée à partir de l'ammoniaque grâce au cycle de l'urée qui est localisé dans les hépatocytes périportaux, tandis que les hépatocytes périveineux sont équipés pour transformer l'ammoniaque en glutamine via l'action de la glutamine synthétase (GS). La synthèse d'urée a une faible affinité pour l'ammoniaque mais possède une grande capacité tandis que la synthèse de glutamine possède une haute affinité mais une faible capacité à éliminer l'ammoniaque (Haussinger., 1986). La synthèse d'urée représente approximativement 70% de l'élimination hépatique d'ammoniaque tandis que les 30% restants sont représentés par la synthèse de glutamine. La GS contenue dans les hépatocytes périveineux sert à détoxifier l'ammoniaque qui n'a pas été utilisé par le cycle de l'urée.

3.3.2. Élimination de l'ammoniaque par les muscles squelettiques

Contrairement au foie, les muscles squelettiques ne possèdent pas un cycle de l'urée fonctionnel et s'appuient uniquement sur la synthèse de glutamine pour éliminer l'excès d'ammoniaque plasmatique. L'activité de la GS dans le muscle est faible et donc c'est surtout la masse totale de muscles qui en fait un des organes majeurs d'élimination de l'ammoniaque artériel. Néanmoins, les différences artérioveineuses d'ammoniaque au travers des muscles sont faibles ce qui suggère que le muscle doit produire et consommer de l'ammoniaque en continu (Olde Damink et coll., 2002a). Il a été avancé que, dans des conditions physiologiques normales, la

moitié de l'ammoniaque artériel est métabolisée par les muscles squelettiques (Lockwood et coll., 1979).

La GS musculaire est une protéine inductible. Une étude a révélé que l'expression et l'activité de la GS étaient augmentées lors d'une insuffisance hépatique chronique induite par une anastomose portocave (Desjardins et coll., 1999).

3.3.3. Élimination de l'ammoniaque par le cerveau

Le cerveau, tout comme le muscle, est incapable de convertir l'ammoniaque en urée et s'appuie presque exclusivement sur la synthèse de glutamine pour le détoxifier. Comme nous l'avons vu précédemment, le cerveau possède à la fois l'enzyme produisant de l'ammoniaque (la glutaminase) et l'enzyme le consommant. Cependant la localisation cellulaire de ces enzymes est différente. La synthèse de glutamine a lieu dans les astrocytes (Norenberg et Martinez-Hernandez., 1979) tandis que la production d'ammoniaque à partir de la glutamine a lieu surtout, voire même exclusivement, dans les neurones (Aoki et coll., 1991; Kvamme et coll., 2001). Puisque la production d'ammoniaque à partir de la glutamine a lieu dans les neurones et que l'élimination de l'ammoniaque a lieu dans les astrocytes, il y a donc une circulation intercellulaire d'ammoniaque entre ces deux types cellulaires qui va donner naissance au cycle glutamate-glutamine dans le cerveau (voir paragraphe 4.2.1 du chapitre 1).

Les taux d'ammoniaque dans le cerveau sont maintenus à un niveau relativement bas (40-50 μM) (Butterworth., 1998b). Il a été montré que dans les conditions normales la GS cérébrale opère quasiment à sa capacité maximale (Cooper et Plum., 1987).

3.3.4. Élimination de l'ammoniaque par le colon

Le colon contrairement au cerveau, rein et muscle, ne s'appuie pas sur la synthèse de glutamine pour éliminer l'ammoniaque. Il est l'un des principaux site de production d'ammoniaque dans des conditions normales. Néanmoins, le colon peut devenir un site d'élimination de l'ammoniaque lors d'une hyperammoniémie à la suite de l'administration du lactulose.

Le lactulose est un glucide qui n'est pas digérable par les enzymes des mammifères et qui va influencer la composition et l'activité métabolique de la flore intestinale (Zentek et coll., 2002). Le lactulose acidifie le pH intestinal ce qui réduit l'absorption de l'ammoniaque au niveau des entérocytes et aura pour conséquence de réduire la production d'ammoniaque par le colon. Aussi, son métabolisme par la flore intestinale augmente l'incorporation bactérienne d'azote en plus d'augmenter la masse bactérienne (Weber, Jr., 1997); ce qui de part ses propriétés cathartiques, va conduire à une augmentation de la concentration et l'excrétion d'ammoniaque dans les matières fécales (Bird et coll., 1990; Zentek et coll., 2002).

On utilise le lactulose comment traitement thérapeutique dans le but de prévenir l'apparition de l'encéphalopathie lors d'une insuffisance hépatique chronique.

3.4. L'ammoniaque et l'insuffisance hépatique aiguë

Les maladies hépatiques et l'insuffisance hépatocellulaire qui en résulte induisent des perturbations sévères de l'homéostasie de l'azote. Dans le cas d'une IHA, on observe une diminution de la capacité de synthèse de l'urée et de la glutamine par le foie qui va conduire à une diminution de l'élimination de

l'ammoniaque (Dejong et coll., 1996). Cette baisse de la détoxification va induire une élévation des taux d'ammoniaque plasmatique qui vont atteindre 100 à 450 μM lors d'une IHA chez l'humain (Clemmesen et coll., 1999). Il semblerait que lors d'une insuffisance hépatique, la réduction de la capacité de détoxification de l'ammoniaque plutôt qu'une augmentation de la production d'ammoniaque par les intestins, serait la cause principale de l'hyperammoniémie observée (Olde Damink et coll., 2002a).

Le NH_3 traverse plus facilement les membranes cellulaires que le NH_4^+ . L'infusion d'une solution directement dans la carotide de rats normaux a suggéré que l'ammoniaque plasmatique entre dans le cerveau majoritairement par diffusion plutôt que par un système de transport saturable (Cooper et coll., 1979). Dans la même étude, les auteurs ont démontré que l'indice de capture d'ammoniaque par le cerveau est indépendant des taux d'ammoniaque artériels sur un large éventail de concentrations chez les animaux normaux (Cooper et coll., 1979).

De plus, dans des conditions physiologiques normales, 98 à 99% de l'ammoniaque présent dans le sang est sous la forme ionique NH_4^+ (Bromberg et coll., 1960). Donc bien que les ions NH_4^+ aient une perméabilité au travers de la BHE de 0.5% de celle du NH_3 , leur concentration plasmatique nettement supérieure à celle du NH_3 (50 fois) (Raichle et Larson., 1981) a conduit à l'estimation que jusqu'à 25% de l'ammoniaque pouvait entrer dans le cerveau sous forme de NH_4^+ à des valeurs de pH physiologiques (Cooper et Plum., 1987).

En résumé on peut donc dire que l'ammoniaque pénètre la BHE facilement par diffusion libre (NH_3) et plus difficilement par transport (NH_4^+). La plus faible perméabilité du NH_4^+ implique que le transfert d'ammoniaque au travers de la barrière hémato-encéphalique va être dépendant du pH artériel et qu'une alcalose va

exacerber la toxicité de l'ammoniaque (Warren et Nathan., 1958) puisque des valeurs de pH sanguin plus élevées vont favoriser la formation de NH_3 qui diffuse facilement au travers de la BHE. Puisque le passage de l'ammoniaque au travers de la BHE est dépendant du pH, le gradient de pH entre le sang et le cerveau peut affecter les concentrations cérébrales d'ammoniaque. Dans des conditions normales, le pH du sang et le pH intracellulaire du cerveau sont respectivement de 7,4 et 7,1 ce qui prédit une proportion d'ammoniaque cerveau/sang de 2 (Cooper et Plum., 1987). Mais comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, ce rapport est augmenté lors d'une insuffisance hépatique chronique ou aiguë.

Lors d'une hyperammoniémie, les différents organes impliqués dans le métabolisme de l'ammoniaque réagissent de plusieurs façons.

Les reins qui normalement libèrent 70% de l'ammoniaque dans le sang, excrètent 70% de l'ammoniaque produit dans l'urine lors d'une IHA (Dejong et coll., 1996).

Dans un modèle animal, il a été démontré qu'une insuffisance hépatique causée par une occlusion de la veine porte en deux étapes (conduisant à une élévation de 3 fois des niveaux d'ammoniaque plasmatique) avait pour effet d'augmenter (8 fois) l'activité de la GS dans le muscle (Hod et coll., 1982). Cette induction de l'activité de la GS était accompagnée par une augmentation de la concentration de glutamine dans le sang.

Contrairement au muscle, le cerveau n'est pas capable d'induire la GS dans des conditions hyperammoniémiques et donc l'activité de la GS n'augmente pas en réponse à l'augmentation des taux d'ammoniaque (Cooper et coll., 1985). De fait une inhibition de son activité a été rapportée dans certaines régions du cerveau (le cortex

cérébral et le cervelet) de rats ayant une anastomose portocave (Desjardins et coll., 1999) et dans le cerveau de patients cirrhotiques mort en coma hépatique (Lavoie et coll., 1987). La GS cérébrale ne serait donc pas capable de s'adapter aux élévations des taux d'ammoniaque dans le cerveau qui deviendront potentiellement neurotoxiques lors d'une IHA.

4. EFFETS DE L'AMMONIAQUE SUR LA FONCTION CÉRÉBRALE

On sait que lorsque la fonction hépatique se détériore, les taux d'ammoniaque plasmatique et cérébral augmentent et qu'une encéphalopathie hépatique apparaît. L'infusion d'ammoniaque conduisant à des niveaux d'ammoniaque plasmatique comparables à ceux observés chez des patients en coma hépatique induit un syndrome clinique et des changements neuropathologiques qui sont indiscernables de l'EH. L'ammoniaque perturbe la neurotransmission et la fonction astrocytaire.

4.1. Altérations de la neurotransmission (électrophysiologie)

Les ions ammonium affectent à la fois la transmission synaptique excitatrice et inhibitrice dans le cerveau des mammifères par des mécanismes variés (Szerb et Butterworth., 1992).

Une dépression de la transmission synaptique excitatrice par le NH_4^+ a été décrite aussi bien *in vivo* (Theoret et Bossu., 1985; Raabe., 1990) qu'*in vitro*, en réalisant des enregistrements électrophysiologiques extracellulaires (Theoret et coll., 1985; Fan et coll., 1990) et intracellulaires (Alger et Nicoll., 1983). La perfusion *in vivo* du ventricule latéral avec de l'ammonium conduit à une inhibition de la

neurotransmission excitatrice (Theoret et Bossu., 1985), et les infusions de sels d'ammonium conduisent à une suppression du réflexe excitateur monosynaptique de la moelle épinière (Raabe., 1990). Trois mécanismes (deux présynaptiques et un postsynaptique) ont été proposés pour expliquer cette dépression de la transmission excitatrice par les ions ammonium. Au niveau présynaptique, l'ammonium réduit la libération du transmetteur (glutamate) en inhibant sa synthèse à partir de la glutamine dans la terminaison nerveuse (Hamberger et coll., 1982) ou en bloquant la conduction du potentiel d'action dans la terminaison présynaptique (Hamberger et coll., 1982). Au niveau postsynaptique, les ions ammonium peuvent réduire l'efficacité de la libération de glutamate par un effet direct sur les récepteurs au glutamate (Fan et coll., 1990). Il faut aussi ajouter un effet inhibiteur de l'ammoniaque sur la capture du glutamate par les astrocytes (qui devrait potentialiser plutôt qu'inhiber la transmission glutamatergique). L'effet de l'ammoniaque sur la neurotransmission glutamatergique sera détaillé dans le paragraphe suivant.

Les ions ammonium, en plus d'induire une dépression de la transmission excitatrice, sont aussi capables de déprimer la transmission inhibitrice. L'ammonium déprime l'hyperpolarisation postsynaptique (Lux., 1971; Raabe et Lin., 1983) dans plusieurs préparations neurales, incluant les motoneurones de la moelle épinière, les motoneurones trochléaires et les neurones de la voie pyramidale du néocortex. Au cours de ces expériences *in vivo*, il a été démontré que les ions ammoniums étaient capables de réduire ou d'abolir l'hyperpolarisation membranaire en inactivant l'extrusion des ions chlore (Raabe., 1987).

4.2. Effets de l'ammoniaque sur le système glutamatergique

4.2.1. Physiologie du système glutamatergique

Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur majeur dans le cerveau des mammifères. Au cours des 20 dernières années, de nombreuses évidences ont été accumulées et rapportent que des altérations de la neurotransmission glutamatergique sont impliquées dans différents troubles neurologiques incluant l'épilepsie, la maladie d'Alzheimer, et la sclérose latérale amyotrophique, mais aussi l'ischémie induite par un infarctus. Les voies glutamatergiques sont impliquées dans l'apprentissage et la mémoire. Ces dernières années, les résultats de plusieurs études ont suggéré que des altérations de ce système seraient impliquées dans la pathogenèse de l'encéphalopathie hépatique.

Le glutamate est contenu dans au moins 4 compartiments distincts dans le cerveau. On le trouve dans les terminaisons nerveuses glutamatergiques, dans les terminaisons GABAergiques (où le glutamate sert de précurseur), dans un pool astrocytaire où il est associé avec le métabolisme de l'ammoniaque (synthèse de glutamine) et enfin on le retrouve dans un pool métabolique multicellulaire associé avec le métabolisme énergétique. Un schéma simplifié du système de neurotransmission glutamatergique est présenté dans la figure 1.

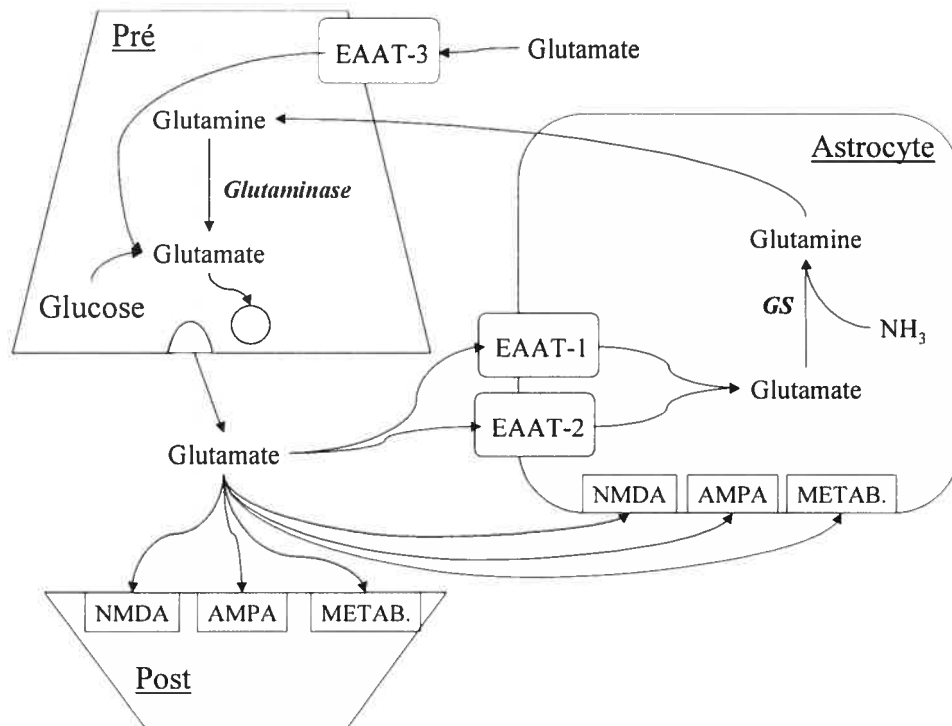


Figure 1 : Schéma simplifié représentatif de la neurotransmission glutamatergique dans le cerveau.

4.2.1.1. Synthèse du glutamate

Dans les terminaisons nerveuses glutamatergiques, le glutamate est synthétisé à partir de deux sources : à partir du glucose via le cycle de Krebs et à partir de la glutamine provenant des cellules gliales qui sera convertie en glutamate sous l'action de la glutaminase. Dans les neurones glutamatergiques, le glutamate est stocké dans des vésicules synaptiques et il est libéré, lors d'une dépolarisation, par exocytose dépendante des ions calcium. Une fois dans la cleft synaptique le glutamate va activer des récepteurs sur la membrane postsynaptique et sur la membrane des astrocytes entourant la synapse.

4.2.1.2. Récepteurs du glutamate

Il existe deux classes majeures de récepteurs au glutamate dans le système nerveux central des mammifères. On distingue les récepteurs-canaux ionotropiques et les récepteurs métabotropiques.

L'activation des récepteurs ionotropiques conduit à une entrée d'ions Na^+ , K^+ et Ca^{2+} dans la cellule. Il existe deux sous-types de récepteurs ionotropiques qui sont classifiés selon leurs propriétés pharmacologiques. Le premier sous-type est appelé récepteur NMDA car il a pour agoniste spécifique le *N*-méthyl-D-aspartate (NMDA), l'autre sous-type a pour agonistes l'acide α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionique (AMPA) et le kainate et est donc appelé le sous type AMPA-Kainate (ou non-NMDA). Ces récepteurs ont des compositions moléculaires distinctes (sous-unités) ainsi que des localisations cellulaires et régionales différentes dans le système nerveux central (Monaghan et coll., 1989).

L'autre classe de récepteurs glutamatergiques est représentée par les récepteurs métabotropiques. Ce ne sont pas des canaux ioniques, mais ils vont moduler, par l'intermédiaire de protéines G, la fonction de certaines enzymes et de certains canaux ioniques tels que les phospholipases C et D et l'adénylate cyclase. Le profil d'expression des différents types de récepteurs au glutamate est spécifique à chaque type cellulaire.

Au niveau post-synaptique, on retrouve sur les membranes neuronales les récepteurs NMDA, AMPA/Kainate et métabotropiques, tandis qu'au niveau des astrocytes on retrouve uniquement les récepteurs de type AMPA/kainate et métabotropiques. Cependant, des évidences récentes suggèrent que les astrocytes

possèderaient aussi des récepteurs NMDA sur leur membrane plasmique dans le cortex cérébral humain (Conti et coll., 1999) et dans le cortex du rat adulte (Conti et coll., 1996). L'activation des récepteurs post-synaptiques par le glutamate va conduire à une entrée d'ions Ca^{2+} et Na^+ qui va dépolariser la cellule post-synaptique.

4.2.1.3. Transporteurs du glutamate

Pour mettre fin au signal, le glutamate est éliminé de la cleft synaptique par une famille de transporteurs à haute affinité qui sont localisés principalement sur les astrocytes. Le transport du glutamate est actif et s'appuie sur le gradient de Na^+ pour permettre au glutamate d'entrer dans la cellule. Ce gradient est maintenu par l'activité, dépendante de l'ATP, des pompes Na^+/K^+ . La capture du glutamate dans le système nerveux central a été revue en détail par Danbolt (2001). Sur les astrocytes on distingue deux types de transporteur : EAAT-1 (aussi appelé GLAST) et EAAT-2 (GLT-1). Sur les neurones on retrouve le transporteur EAAT-3 (EAAC-1). Le transport du glutamate est très efficace et les concentrations de glutamate extracellulaire sont maintenues à des niveaux faibles (3-4 μM) (Danbolt., 2001) afin de prévenir des dommages excitotoxiques et aussi afin de recycler le neurotransmetteur. En effet, une fois dans l'astrocyte, la GS va catalyser la transformation du glutamate en glutamine. La glutamine ainsi formée va alors être libérée dans l'espace extracellulaire à partir duquel elle sera transportée dans le neurone présynaptique où elle servira de précurseur pour la synthèse de glutamate qui est impliqué dans la neurotransmission. Cet échange de glutamate et de glutamine entre les neurones et les astrocytes est appelé le cycle glutamate-glutamine.

4.2.2. Effet de l'ammoniaque

4.2.2.1. Effets de l'ammoniaque sur les niveaux de glutamate intracellulaire

L'hyperammoniémie aiguë associée à une IHA conduit à une réduction des niveaux cérébraux de glutamate (Tyce et coll., 1981; Mans et coll., 1994). Une réduction de la quantité de glutamate dans les terminaisons nerveuses pourrait perturber la neurotransmission excitatrice ou l'inhibitrice tandis qu'une réduction des niveaux de glutamate dans le pool astrocytaire pourrait conduire à une diminution de la capacité à détoxiquer l'ammoniaque du fait d'un manque de substrat. Il existe plusieurs évidences suggérant que l'hyperammoniémie conduit à une limitation de la capacité du cerveau à éliminer l'ammoniaque provenant du sang (Ukida et coll., 1988) et conduit aussi à une diminution de l'incorporation du glucose en glutamate et en GABA (Prior et Vissek., 1972). La réduction des niveaux de glutamate cérébral est proportionnelle à la détérioration du statut neurologique des animaux ayant une IHA induite par une dévascularisation hépatique (Swain et coll., 1992b). Les concentrations de glutamate intracellulaire sont aussi réduites dans le cerveau de patients morts à la suite d'une IHA (Record et coll., 1976). Cependant, la baisse des concentrations intracellulaires de glutamate n'indique pas forcément un déficit de la neurotransmission glutamatergique puisque son métabolisme dans le cerveau est très compartimenté. Des évidences ont montré qu'il y avait des perturbations de la circulation du glutamate entre les neurones et les astrocytes lors d'une IHA.

4.2.2.2. Effets de l'ammoniaque sur les niveaux de glutamate extracellulaire

L'hypothèse d'une perturbation de la circulation du glutamate entre les neurones et les astrocytes est supportée par les résultats de plusieurs études réalisées dans des modèles expérimentaux d'IHA qui ont rapporté des augmentations des niveaux de glutamate extracellulaire en fonction de la dégradation du statut neurologique des animaux (Bosman et coll., 1992; de Knecht et coll., 1994b; Michalak et coll., 1996). Bosman et al., en 1992, ont mis en évidence, chez des rats ayant une IHA, une baisse des concentrations totales de glutamate dans le cortex et une hausse concomitante des taux de glutamate extracellulaire de quasiment 500% par rapport au contrôle, ce qui leur a permis de conclure que la diminution de la synthèse de glutamate n'avait pas pour conséquence de diminuer la neurotransmission glutamatergique (Bosman et coll., 1992). L'étude menée par Michalak et al. (1996) a démontré que les taux de glutamate extracellulaire étaient 2 à 3 fois plus élevés chez les animaux ayant une IHA par rapport aux animaux contrôles. Deux études très récentes conduites chez l'humain par microdialyse ont rapporté que les taux de glutamate extracellulaire étaient 5 fois plus élevés que la normale, chez les patients ayant une IHA (Tofteng et coll., 2002; Tofteng et Larsen., 2002). Une diminution de la synthèse de glutamate ne conduit donc pas à une diminution de la neurotransmission glutamatergique lors d'une IHA. L'origine des élévations des niveaux de glutamate extracellulaire a été attribuée à une baisse de sa capture par les astrocytes mais aussi à une augmentation de sa libération par les terminaisons nerveuses.

Des études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que l'exposition à l'ammoniaque altère l'expression et l'activité des transporteurs du glutamate (Butterworth., 2002). La perfusion de tranches d'hippocampe de rat avec des concentrations millimolaires d'ammoniaque réduit leur capacité à capter le D-aspartate (un analogue non métabolisable du glutamate) (Schmidt et coll., 1990). L'exposition à l'ammoniaque de cultures d'astrocytes corticaux de rat induit une diminution significative de l'expression de l'ARNm et de la protéine EAAT-1. Cette perte de l'expression de EAAT-1, induite par l'ammoniaque, s'accompagne d'une réduction de la capacité de ces cellules à transporter le D-aspartate (Chan et Butterworth., 1999; Chan et coll., 2000). De plus, l'expression de l'ARNm et de la protéine de l'autre transporteur astrocytaire du glutamate, EAAT-2, est réduite dans le cortex frontal de rats ayant une IHA induite par une dévascularisation hépatique (Knecht et coll., 1997) et dans le cerveau de souris ayant une IHA induite par la thioacétamide (Norenberg et coll., 1997). Une fois encore, la perte de l'expression de ce transporteur dans le cerveau de rats ayant une IHA s'accompagne d'une perte significative de la capacité de capture à haute affinité du D-aspartate par des préparations cérébrales obtenues à partir de ces animaux (Butterworth., 2002). De plus, il a été démontré dans le même modèle animal que la perte de l'expression de EAAT-2 dans le cortex frontal s'accompagne d'une augmentation des niveaux de glutamate extracellulaire dans le cerveau de ces animaux (Michalak et coll., 1996).

Aussi, de Knecht et al. (1994b) ont rapporté que la libération de glutamate induite par le potassium ou la vératridine était augmentée lors d'une IHA. Cette augmentation de la libération de glutamate par les terminaisons nerveuses

participerait donc à l'élévation des taux de glutamate extracellulaire observée lors d'une IHA.

4.2.2.3. Effets de l'ammoniaque sur les récepteurs au glutamate

Une perte sélective des sites de liaison au AMPA et Kainate a été rapportée dans un modèle d'IHA induite par une dévascularisation hépatique (Michalak et Butterworth., 1997), sans changement mesurable des niveaux d'expression des récepteurs NMDA (de Knecht et coll., 1993; Michalak et coll., 1996). Cette perte du nombre de sites de liaison pourrait représenter une "downregulation" des récepteurs AMPA-Kainate à la suite d'une surexposition au glutamate.

La combinaison d'une densité de récepteurs au NMDA inchangée et d'une élévation des taux de glutamate extracellulaire dans le même animal lors d'une IHA (Michalak et coll., 1996) suggère qu'il y aurait une augmentation de la neurotransmission glutamatergique liée au NMDA dans ce modèle animal. En faveur d'une augmentation de la neurotransmission glutamatergique lors d'une hyperammoniémie, on trouve les résultats de deux études qui ont rapporté que la mortalité due à la toxicité de l'ammoniaque chez des animaux normaux pouvait être prévenue par l'administration d'antagonistes spécifiques des récepteurs NMDA (Marcaida et coll., 1992; Hermenegildo et coll., 1996). L'implication de l'activation des récepteurs NMDA dans la pathogenèse de l'EH lors d'une IHA est renforcée par l'observation, dans deux modèles animaux d'IHA, d'une amélioration du statut neurologique après l'administration de la mémantine (un antagoniste non-compétitif des récepteurs NMDA) (Vogels et coll., 1997).

4.3. Effets de l'ammoniaque sur la neurotransmission GABAergique

L'acide γ -aminobutyrique (GABA) est le neurotransmetteur inhibiteur majeur dans le cerveau (Basile et coll., 1991). On le retrouve dans la circulation sanguine mais il ne traverse pas la BHE. Le système GABAergique a été largement étudié dans les syndromes hyperammonémiques.

4.3.1. Physiologie du système GABAergique

Les neurones GABAergiques synthétisent le GABA à partir du glutamate (voir paragraphe 5.3.4 de ce chapitre). Après dépolarisation, le GABA est libéré par exocytose et va agir sur différents récepteurs.

Il existe deux types de récepteurs au GABA distingués par leurs propriétés moléculaires et par leurs systèmes effecteurs. Les récepteurs GABA_A sont des récepteurs ionotropiques dont le canal ionique est une structure pentamérique composée de différentes combinaisons de sous-unités (Rudolph et coll., 2001). L'activation de ces récepteurs conduit à une entrée d'ions chlore dans la cellule qui va provoquer une hyperpolarisation de la cellule. On distingue sur le récepteur au GABA_A, 2 sites de liaison au GABA mais on distingue aussi des sites de liaisons à des molécules qui vont moduler l'activation du récepteur, comme les benzodiazépines, l'éthanol et les neurostéroïdes (Schumacher et McEwen., 1989). L'autre type de récepteurs au GABA, est un récepteur couplé à une protéine G qui est appelé GABA_B. Leur stimulation modifie l'activité de l'adénylate cyclase, diminue la conductance au calcium et augmente la conductance au potassium dans les neurones (Enna., 2001).

La neurotransmission GABAergique est terminée par un système spécifique de transport. On distingue 4 types de transporteurs au GABA, GAT1 est majoritairement situé sur les cellules neuronales et GAT2, GAT3 et GAT4 sont situés quasi préférentiellement sur les cellules non-neuronales (Schousboe et coll., 2004).

4.3.2. Effets de l'ammoniaque

Le système GABAergique a été étudié de façon extensive dans les syndromes hyperammonémiques et les résultats de ces études sont souvent contradictoires.

Il a été démontré que l'ammoniaque pouvait augmenter la neurotransmission GABAergique en exerçant une interaction directe avec le récepteur. En effet, l'ajout d'ammoniaque (0.2 – 0.5 mM) à des cultures cellulaires de neurones provoque une augmentation du courant chlore induit par le GABA, dépendante de la concentration d'ammoniaque utilisée (Takahashi et coll., 1993) et qui est probablement le résultat d'une augmentation, causée par l'ammoniaque, de l'affinité du récepteur GABA pour le GABA. Aussi, l'exposition de préparations cérébrales de rat à l'ammoniaque entraîne une modification de la capacité des benzodiazépines à potentialiser la liaison du ³H-Muscimol (agoniste GABA_A) sur son récepteur ce qui suggère que l'ammoniaque a aussi un effet sur le couplage entre le site au GABA et le site aux benzodiazépines sur le récepteur GABA_A (Basile., 2002). L'ammoniaque exerce aussi des effets sur le transport du GABA dans les astrocytes. Des études *in vitro* ont rapporté que l'exposition aiguë à l'ammoniaque de cultures d'astrocytes conduisait à une diminution de 30% de la capture du GABA (Bender et Norenberg., 2000). Cependant ces effets n'ont jamais été démontrés *in vivo*.

Une implication du GABA dans l'étiologie de l'IHA a été suggérée par Schafer et Jones (1982) qui ont émis la théorie du GABA dans l'EH, dans laquelle ils affirmaient que le GABA provenant des intestins accédait au cerveau et était responsable d'une augmentation de la neuroinhibition. Cette théorie s'appuyait sur les résultats d'études menées dans des modèles d'IHA induite par la galactosamine dans lesquels des élévations des niveaux cérébraux de GABA et des altérations des enzymes et des récepteurs liés au métabolisme du GABA avaient été rapportées (Baraldi et coll., 1984). Néanmoins, des études plus récentes n'ont pu mettre en évidence des élévations des niveaux de GABA intracellulaire ou extracellulaire dans le cerveau de différents modèles d'insuffisance hépatique (Zimmermann et coll., 1989; Swain et coll., 1992b; Michalak et coll., 1996).

Une absence d'élévation des niveaux de GABA dans le cerveau n'indique pas forcément que la neurotransmission GABAergique soit inchangée. En effet, certaines molécules sont capables de moduler positivement l'activité du GABA et pourraient potentialiser l'effet du GABA lors d'une IHA. De fait, il existe plusieurs évidences suggérant que les concentrations de telles substances, comme les benzodiazépines et les neurostéroïdes pourraient être augmentées dans le cerveau et qu'elles pourraient contribuer ainsi à l'inhibition caractéristique qui est observée lors d'une EH induite par une IHA (Basile., 2002). Il a été démontré que l'IHA se traduit par une augmentation de l'expression et de la densité des récepteurs aux benzodiazépines de type périphérique (PTBR) qui aura pour conséquence de stimuler la synthèse de neurostéroïdes tels que l'allopregnénolone qui potentialise l'effet des récepteurs GABA_A (Desjardins et Butterworth., 2002). D'autres études ont aussi montré une augmentation des niveaux de substances ayant une activité identique à celles des

benzodiazépines à la fois lors d'une IHA humaine (Basile et coll., 1994) et expérimentale (Olasmaa et coll., 1990). Un rôle des benzodiazépines « naturelles » est aussi supporté par l'observation d'un effet bénéfique de l'administration de différents antagonistes des benzodiazépines à des rats ayant une IHA (Baraldi et coll., 1984).

En conclusion, on peut dire que l'IHA et l'hyperammoniémie qui en découle ont des effets sur la neurotransmission et la fonction astrocytaire à différents niveaux. En plus de ces effets, l'hyperammoniémie affecte aussi le métabolisme cérébral du glucose et le débit sanguin cérébral.

5. MÉTABOLISME DU GLUCOSE DANS LE CERVEAU

Le glucose est l'unique substrat plasmatique utilisé par le cerveau normal adulte qui puisse supporter ses demandes métaboliques. La capacité du glucose à maintenir le métabolisme énergétique cérébral est due en partie à la combinaison entre une concentration plasmatique de glucose relativement élevée (~ 12 mM chez les rongeurs non à jeun) et à la présence de puissants transporteurs permettant à ce dernier de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) et les membranes des différentes cellules cérébrales. Ces transporteurs maintiennent des niveaux de glucose dans le cerveau d'environ 2-3 $\mu\text{mol/g}$ de poids humide chez le rat (Pfeuffer et coll., 2000). Environ 40% du glucose cérébral est utilisé pour maintenir l'homéostasie ionique (Kawamata et coll., 1995).

Au niveau du cerveau, le glucose est généralement complètement oxydé mais il peut aussi être utilisé pour synthétiser du lactate et des acides aminés. L'oxydation

complète du glucose se fait en plusieurs étapes. La première est extra-mitochondriale et conduit à la production de 2 molécules de pyruvate, c'est la glycolyse. Le pyruvate ainsi formé peut avoir plusieurs destinées métaboliques selon l'état d'oxygénation et l'activité synthétique de la cellule.

Dans des conditions normales d'oxygénation, le pyruvate entre dans la mitochondrie pour être complètement oxydé en CO_2 et H_2O . C'est le cycle de Krebs.

Dans des conditions où le cycle de Krebs est inhibé (par exemple lors d'une anoxie) ou que l'activité de la glycolyse est supérieure à celle du cycle de Krebs, le pyruvate est alors transformé en lactate plus du NAD^+ par la lactate déshydrogénase.

Dans des conditions normales, le pyruvate peut aussi être utilisé pour synthétiser des acides aminés directement ou à partir d'intermédiaires du cycle de Krebs.

5.1. La glycolyse

La glycolyse est composée d'une série de réactions conduisant à la formation du pyruvate qui impliquent 8 enzymes. Parmi ces enzymes, la phosphofructokinase est l'enzyme qui catalyse la transformation du fructose-6-P en fructose-1,6-BisP. C'est l'enzyme limitante de la réaction et donc son activité propre va déterminer l'activité totale de la glycolyse (Lowry et coll., 1964).

5.2. Cycle de Krebs

Le pyruvate peut entrer dans le cycle de Krebs selon deux voies qui au niveau du cerveau sont spécifiques à certains types cellulaires (Figure 2, paragraphe 5.5 chapitre 1).

Au niveau des astrocytes et des neurones, le pyruvate est d'abord transformé en acétyl-coenzyme A (CoA) par la pyruvate déshydrogénase (PDH). L'acétyl-CoA va ensuite entrer dans le cycle de Krebs et va être combiné à l'oxaloacétate (OAA) pour former de l'acide citrique. L'acide citrique va alors subir plusieurs réactions métaboliques conduisant à la formation de CO₂ et d'équivalents réducteurs qui seront utilisés dans la chaîne respiratoire pour synthétiser de l'ATP. La dernière réaction du cycle conduit à la régénération de la molécule d'OAA qui avait été utilisée lors de la première réaction. Il semblerait que la PDH soit une enzyme limitante de l'oxydation du glucose.

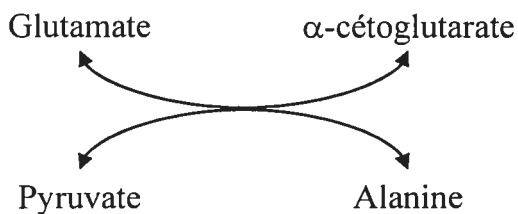
Comme nous le verrons dans la section suivante, certains intermédiaires du cycle de Krebs peuvent quitter ce dernier pour être utilisés dans d'autres voies métaboliques. Dans les cas où ce phénomène se produit, il va y avoir une baisse des quantités d'OAA et la capacité du cycle à accepter l'acétyl-CoA va donc diminuer. Pour pallier à cette baisse d'OAA au niveau du cerveau, les astrocytes (uniquement) possèdent la pyruvate carboxylase (PC) qui catalyse la carboxylation du pyruvate en OAA qui va ensuite entrer dans le cycle de Krebs pour remplacer le squelette carboné.

5.3. Synthèse d'acides aminés

Le pyruvate et certains intermédiaires du cycle de Krebs, notamment, l' α -cétooglutarate servent de précurseurs pour la synthèse d'acides aminés tels que l'alanine, le glutamate, la glutamine, le GABA et le N-acétyl-aspartate (NAA).

5.3.1. Alanine

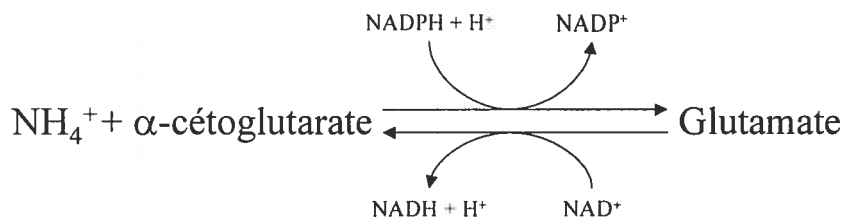
L'alanine est synthétisée par la transamination du pyruvate qui est catalysée par l'alanine aminotransférase (ALAT) selon la réaction suivante:



C'est une réaction réversible.

5.3.2. Glutamate

Le glutamate est synthétisé à partir d'un intermédiaire du cycle de Krebs, l'α-cétoglutarate, par une réaction catalysée par la glutamate déshydrogénase (GDH) qui est, elle aussi, bidirectionnelle:



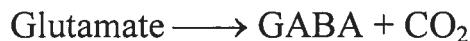
5.3.3. Glutamine

La glutamine est synthétisée dans le cerveau au niveau des astrocytes uniquement (Norenberg et Martinez-Hernandez., 1979), via la réaction catalysée par la glutamine synthétase (GS) utilisant le glutamate comme substrat:



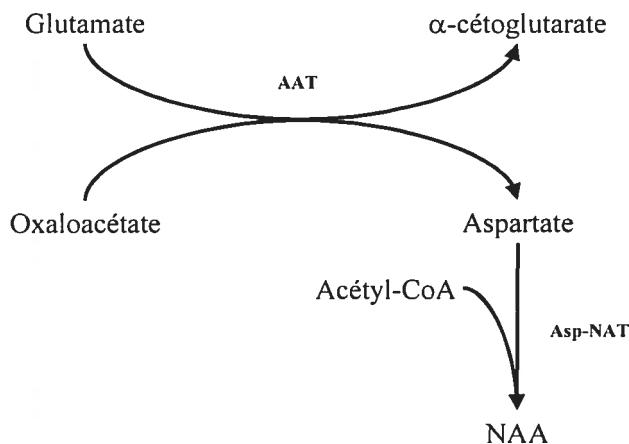
5.3.4. GABA

Le GABA est synthétisé dans le cerveau par décarboxylation du glutamate. Cette réaction est catalysée par la décarboxylase de l'acide glutamique (GAD):



5.3.5. Aspartate et N-acétyl-aspartate

L'aspartate est synthétisé par transamination du glutamate avec l'oxaloacétate, réaction catalysée par l'aspartate aminotransférase (AAT). Le N-acétyl-aspartate est synthétisé dans les mitochondries neuronales, par le transfert d'un groupement acétyle provenant de l'acétyl-CoA sur une molécule d'aspartate. Cette réaction est catalysée par l'aspartate N-acétyl-transférase (Asp-NAT).



5.4. Glycolyse anaérobie (synthèse du lactate).

Les neurones et les astrocytes possèdent, tous deux, une enzyme capable de régénérer les équivalents réducteurs qui sont nécessaires à la synthèse d'ATP au

cours de la glycolyse, à partir du pyruvate sans nécessiter d'oxygène, d'où le nom de glycolyse anaérobie. Cette enzyme est la lactate déshydrogénase (LDH). Elle catalyse la réaction suivante:



5.5. Bilan

Un bilan du métabolisme du glucose est présenté dans la figure 2 de ce paragraphe. Le glucose est transformé en pyruvate lors de la glycolyse et peut alors entrer dans plusieurs voies métaboliques. Le pyruvate peut être directement utilisé pour synthétiser du lactate ou de l'alanine.

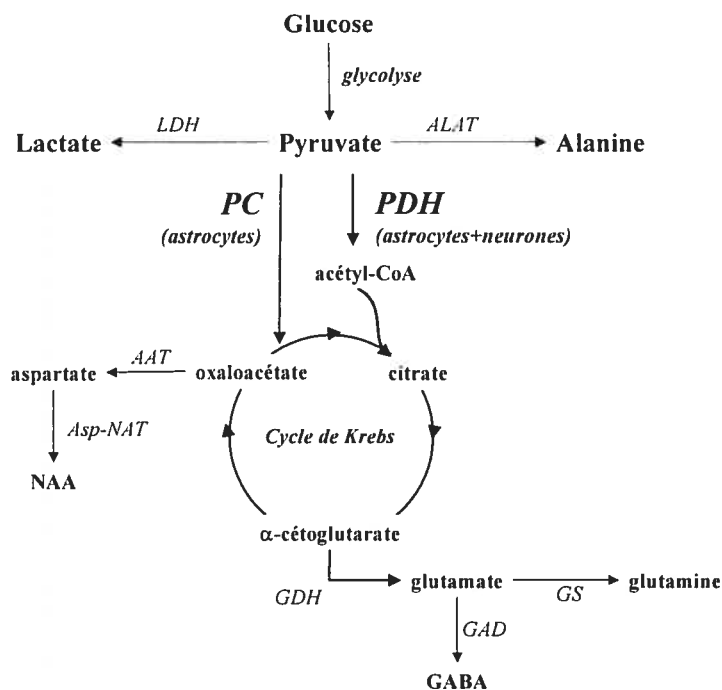


Figure 2: Destinées principales du glucose dans le cerveau.

AAT: aspartate aminotransférase; ALAT: alanine aminotransférase; Asp-NAT: aspartate N-acétyl-transférase; GAD: décarboxylase de l'acide glutamique; GDH: glutamate déshydrogénase; GS: glutamine synthétase; LDH: lactate déshydrogénase; PC: pyruvate carboxylase; PDH: pyruvate déshydrogénase; NAA: N-acétyl-aspartate.

Dans les neurones le pyruvate entre dans le cycle de Krebs via la voie de la PDH uniquement. Au niveau des astrocytes, il entre dans le cycle via la voie de la PDH et via la voie de la PC. Dans les deux types cellulaires le pyruvate peut être complètement oxydé ou il peut aussi être transformé en α -cétoglutarate qui sera utilisé pour synthétiser le glutamate puis la glutamine ou le GABA selon le type cellulaire (astrocytes ou neurones). L'oxaloacétate sera utilisé pour synthétiser de l'aspartate (dans les astrocytes et les neurones) et du N-acétyl-aspartate (dans les neurones uniquement).

5.6. Étude du métabolisme du glucose par la résonance magnétique nucléaire au ^1H et ^{13}C

5.6.1. Principe

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est basée sur plusieurs principes pour identifier et calculer les concentrations de différents composés.

(1) La RMN s'appuie sur les propriétés magnétiques de certains noyaux. Les noyaux des atomes composants les molécules sont en rotation (ils ont un spin) et ils ont souvent une charge nette. Ces propriétés font que la plupart d'entre eux vont former des dipôles magnétiques (figure 3A). De manière générale, les noyaux qui possèdent un nombre pair de protons ou de neutrons comme le ^{12}C (possède 6 protons et 6 neutrons) ou le ^{16}O (8 protons et 8 neutrons) ne sont pas magnétiquement actifs. Ces noyaux ne sont pas détectables par la RMN. En revanche les noyaux possédant

un nombre impair de protons ou de neutrons ont les propriétés d'un dipôle magnétique. On trouve de tels noyaux à l'état naturel, c'est le cas du noyau de ^1H qui est constitué de seulement 1 proton et aussi du ^{13}C qui possède 6 protons et 7 neutrons. Le proton ou le neutron qui ne sera pas en pair va conférer les propriétés magnétiques au noyau qui seront utilisées en RMN pour permettre sa détection. C'est pour cela que l'on utilise des molécules enrichies en ^{13}C (comme le $[1-^{13}\text{C}]\text{Glucose}$) afin de pouvoir détecter ses métabolites par RMN.

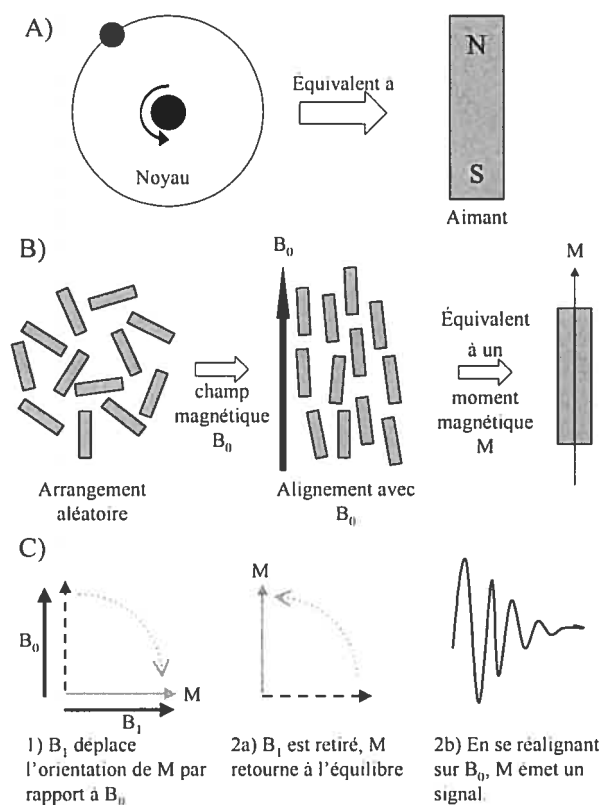


Figure 3: Principes de bases de la résonance magnétique nucléaire.

(A) Un dipôle nucléaire est l'équivalent d'un aimant. (B) A l'état naturel ces dipôles ont une orientation aléatoire. Lorsqu'on les place dans un champ B_0 , ils vont s'aligner avec ce dernier. Cet alignement des différents moments nucléaires génère un moment magnétique net M . (C) Si l'on applique un champ B_1 perpendiculaire à B_0 , il va changer l'orientation de M . Lorsque B_1 est retiré, le moment M se réaligne avec B_0 et en se faisant génère un signal oscillant.

Ces noyaux magnétiquement actifs peuvent être comparés à des aimants avec un pôle nord et un pôle sud (Figure 3A). À l'état naturel, ces « aimants » sont orientés de façon aléatoire de sorte qu'il n'en résulte aucun champ magnétique net et que donc aucun signal de RMN ne peut être généré. Cependant, lorsque l'on place ces noyaux dans un champ magnétique de forte intensité B_0 , une partie d'entre eux vont s'aligner avec B_0 . Il en découle que l'échantillon possède un moment magnétique net M (Figure 3B).

Afin d'obtenir un signal détectable en RMN, on va appliquer un second champ magnétique B_1 (perpendiculaire à B_0) pour « pousser » l'alignement avec B_0 (Figure 3C-1). M va alors s'aligner avec B_1 . Lorsque B_1 sera supprimé, le moment M des noyaux se replace rapidement dans l'alignement de B_0 en oscillant (Figure 3C-2a). Cette oscillation va générer un signal à radiofréquences (Figure 3C-2b). C'est ce signal qui va former la base de la RMN.

Donc les noyaux magnétiquement actifs oscillent pendant qu'ils se réalignent avec B_0 et le signal va être détecté à une fréquence caractéristique de ce noyau (fréquence nominale). Le signal décroît avec le temps à cause d'une perte d'énergie par les noyaux excités qui sera dissipée dans leur entourage. Cette perte d'énergie est appelée relaxation, et elle dépend des différents matériaux et de leur entourage.

(2) La fréquence nominale de résonance d'un noyau magnétiquement actif est affectée par son environnement électronique. En effet, les électrons bloquent partiellement le champ magnétique et vont causer un décalage de la fréquence de résonance d'un noyau contenu dans une molécule par rapport à la fréquence nominale de résonance si ce dernier avait été seul. Ce décalage est appelé déplacement

chimique ou « chemical shift », il est exprimé en particule par millions (ppm) relativement à la fréquence nominale de résonance. Le décalage chimique d'un noyau magnétiquement actif est spécifique et unique à la nature du groupement chimique dans lequel il est contenu. En conséquence, on peut donc identifier un groupement chimique d'une molécule et donc la molécule par le décalage chimique de la fréquence de résonance du noyau actif qui le compose.

De même, lorsque des molécules complexes (composées de plusieurs noyaux actifs) vont être excitées, elles vont générer des signaux multiples à des fréquences différentes spécifiques à tous les groupes chimiques distincts contenant des noyaux actifs. Ces signaux sont détectés simultanément (figure 4). Une technique appelée la transformation de Fourier permet d'obtenir un spectre de RMN à partir des fréquences.

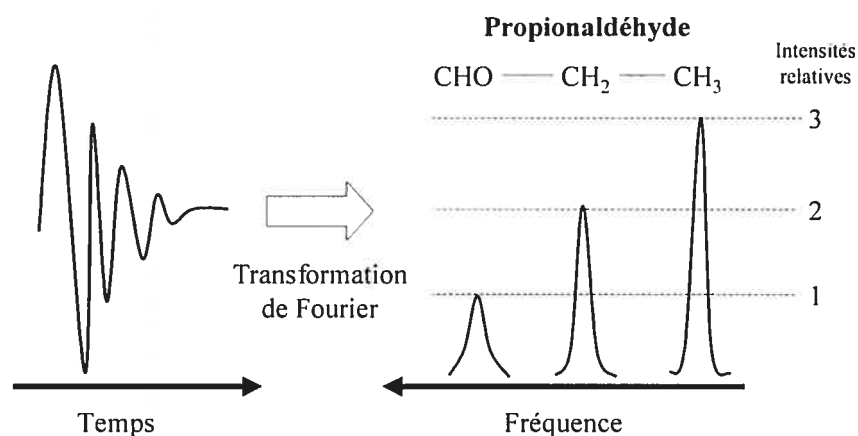


Figure 4: Principe de la transformation de Fourier et du décalage chimique. Les différents groupements chimiques d'une molécule émettent des signaux à des fréquences différentes. Les signaux avec une fréquence multiple peuvent être décodés en plusieurs fréquences grâce à la transformation de Fourier.

Par exemple pour le spectre de RMN de ^1H du propionaldéhyde ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CHO}$) qui possèdent trois groupements hydrogènes (contenant donc des noyaux actifs), on obtiendra trois fréquences de résonance uniques à ce composé et dont la taille des pics sera proportionnelle au nombre de noyau d' ^1H contenu dans chaque groupement chimique (Figure 4). Le décalage chimique du groupe méthyle (CH_3) va être de 1.33 ppm tandis que le décalage du groupe méthine (CH_2) qui est plus proche de l'oxygène du groupement aldéhyde (plus électrophile) va résonner à 4.11 ppm.

Une particularité des molécules contenant plusieurs noyaux magnétiquement actifs est le couplage J . Lorsque deux ou plus, noyaux non-équivalents magnétiquement actifs (par exemple ^1H et ^{13}C) interagissent par une liaison chimique (comme dans le groupement CH_3 par exemple), un couplage J en résulte et ce couplage va conduire à une scission du signal de résonance. Cette propriété fait qu'au lieu d'enregistrer un pic unique à la longueur de résonance du groupement du ^{12}CH en RMN de proton, on obtient 2 pics pour le même groupement chimique contenant un ^{13}C , dans un spectre de résonance au $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$. Le nombre de pics va dépendre du nombre et de l'orientation de chaque dipôle. On va avoir un pic lorsque les dipôles ont la même orientation ($\uparrow^1\text{H}\text{-}\uparrow^{13}\text{C}$) et un pic lorsqu'ils seront orientés en sens contraire ($\uparrow^1\text{H}\text{-}\downarrow^{13}\text{C}$), on obtient donc un doublet (Figure 5). Dépendamment du nombre de noyaux couplés on peut obtenir des multiplets de 2, 3, 4 ou plus de résonance espacés symétriquement autour du « chemical shift » spécifique du groupement chimique. Ce couplage peut être hétéronucléaire (par exemple $^{13}\text{C}\text{-}^1\text{H}$) mais aussi homonucléaire (c'est-à-dire $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$). Aussi, le couplage entre des atomes ^1H non-équivalents va conduire à l'apparition de multiplets lors de l' ^1H -RMN.

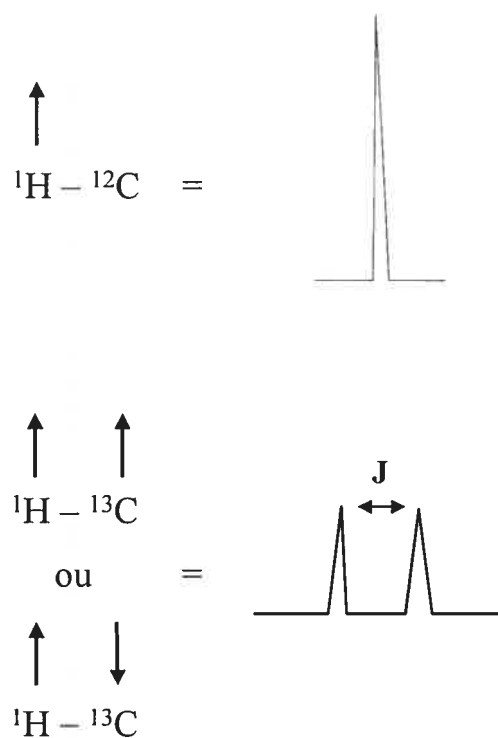


Figure 5: Effet du couplage J sur le déplacement chimique.

Lorsque deux ou plus, dipôles non-équivalents magnétiquement actifs (${}^1\text{H}$ et ${}^{13}\text{C}$) interagissent par une liaison chimique (comme dans le groupement CH_3 par exemple), un couplage J en résulte et va conduire à une scission du signal de résonance. Les pics créés restent centrés sur la fréquence du déplacement chimique qu'ils auraient en l'absence d'un couplage J .

5.6.2. RMN au $[1-{}^{13}\text{C}]$ Glucose

La RMN au ${}^{13}\text{C}$ présente un large déplacement chimique 300 ppm (en comparaison à 10 ppm pour la RMN au ${}^1\text{H}$) ce qui rend cette méthode hautement spécifique d'un point de vue chimique puisque qu'elle permet d'identifier individuellement chaque atome de carbone composant une même molécule. Le ${}^{13}\text{C}$ étant naturellement abondant à seulement 1.1%, cette technique est donc très peu sensible pour détecter les métabolites endogènes à l'état naturel. Cette faible

abondance naturelle peut aussi être un avantage car l'utilisation d'un précurseur enrichi en ^{13}C va permettre de suivre sa voie métabolique en ayant très peu bruit de fond causé par les métabolites endogènes.

L'entrée d'un précurseur marqué au ^{13}C dans une voie métabolique peut être suivie par le déplacement chimique du groupement contenant le carbone 13 dans cette molécule et dans tous les métabolites qui en découlent. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, le déplacement chimique du ^{13}C va être spécifique à la nature du métabolite, mais dans le cas de la RMN par ^{13}C , il va en plus être spécifique à la position du ^{13}C dans ce métabolite. On peut donc identifier en RMN de ^{13}C certains métabolites du glucose marqué au ^{13}C , tels que le glutamate, la glutamine, le GABA, le lactate et l'alanine. De plus l'identification de la position du marquage au ^{13}C du glutamate permet de déterminer sa voie de synthèse à partir du glucose dans le cerveau par RMN de ^{13}C (voir ci-après).

Les molécules d'un même composé dans lesquelles le nombre d'atomes de ^{13}C est identique, mais dont leur position sur le squelette carboné diffère sont appelées isotopomères

5.6.3. Marquage des métabolites du glucose dans le cerveau par le [1- ^{13}C]Glucose

Les voies métaboliques par lesquelles le marquage au ^{13}C du glucose en position 1 ([1- ^{13}C]glucose) est incorporé dans ses différents métabolites au niveau du cerveau sont représentées schématiquement dans la figure 6 de ce chapitre. Après l'injection de [1- ^{13}C]glucose, les intermédiaires de la glycolyse et du cycle de Krebs

sont marqués à différentes positions de carbone selon la voie métabolique qu'ils ont empruntée (voir paragraphe 5.5 de ce chapitre).

Au niveau de la glycolyse, le marquage au ^{13}C du glucose en position 1 se retrouve en position 3 (C3) dans le pyruvate. Comme nous l'avons vu dans la figure 1 de ce chapitre, le pyruvate peut avoir plusieurs destinées. Le $[3-^{13}\text{C}]$ pyruvate aboutira au marquage du lactate et de l'alanine en position C3.

Dans les astrocytes et les neurones, le $[3-^{13}\text{C}]$ pyruvate entre dans le cycle de Krebs par la voie de la PDH. Dans cette voie, le pyruvate est converti en $[2-^{13}\text{C}]$ acétyl-CoA qui conduira au marquage unique du glutamate et de la glutamine en position C4 lors du premier tour de cycle (lors du second tour on obtiendra un double marquage, qui a été omis dans la figure 6 pour des raisons de clarté). La glutamine marquée en position C4 et qui est synthétisée dans les astrocytes uniquement représente donc en partie la synthèse de glutamine à partir du glutamate marqué en C4 synthétisé dans l'astrocyte mais aussi à partir du glutamate marqué en C4 provenant des neurones glutamatergiques et qui aura été transporté dans les astrocytes.

Dans les astrocytes uniquement, le $[3-^{13}\text{C}]$ pyruvate peut emprunter la voie anaplérotique. Dans cette voie, le $[3-^{13}\text{C}]$ pyruvate sera transformé en oxaloacétate qui sera marqué en position C3. Le $[3-^{13}\text{C}]$ oxaloacétate conduira au marquage du glutamate et subséquent de la glutamine en position C2. Le glutamate et la glutamine marqués en position 2 représentent donc le métabolisme astrocytaire spécifiquement.

Dans les neurones GABAergiques, la position du marquage au ^{13}C du GABA est inverse à celle du glutamate, c'est-à-dire que le glutamate marqué en C4 va conduire au GABA marqué en C2 et vice versa.

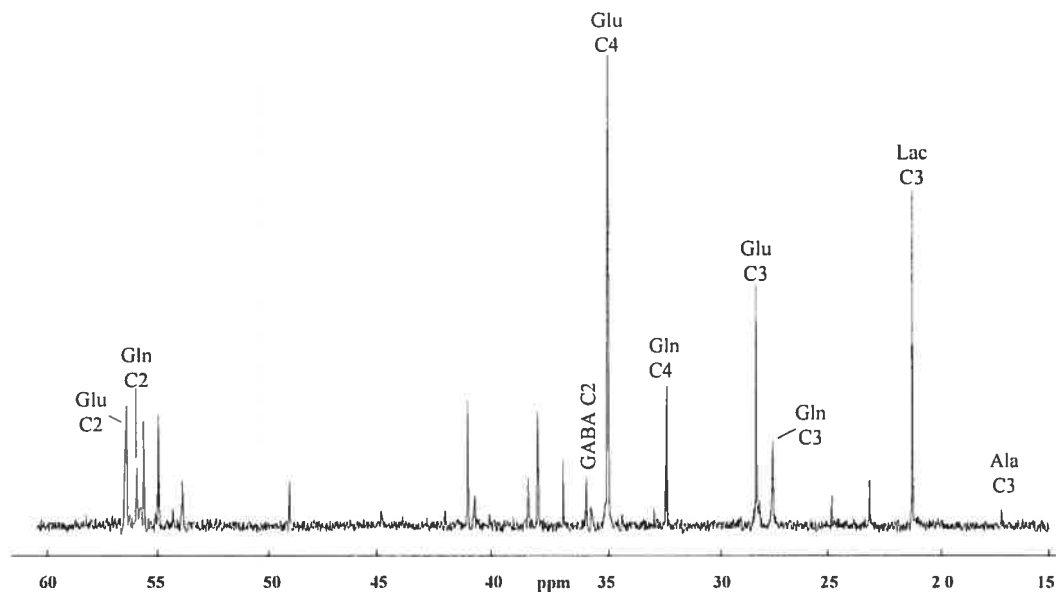


Figure 7 : Spectre typique de ^{13}C RMN d'extrait de cerveau de rat. La figure montre le spectre de ^{13}C RMN d'extrait de cortex frontal d'un rat contrôle 15 minutes après l'injection de $[1-^{13}\text{C}]$ glucose. Détermination des pics : Ala, alanine; GABA, acide γ -aminobutyrique; Glu, glutamate; Gln, glutamine ; Lac, Lactate.

Les isotopomères provenant du premier tour du cycle de Krebs via la voie de la PDH ou de la PC apparaissent comme des singulets (c'est-à-dire des métabolites monomarqués) dans les spectres de ^{13}C -RMN. Un spectre typique de ^{13}C -RMN est présenté dans la figure 7.

5.7. Effets de l'ammoniaque sur le métabolisme énergétique cérébral

L'ammoniaque stimule la glycolyse dans les extraits de cerveau en activant la phosphofructokinase (Sugden et Newsholme., 1975), cette activation pourrait expliquer la stimulation de l'utilisation cérébrale du glucose qui a été rapportée chez les animaux rendus hyperammoniémiques de façon aiguë (Hawkins et coll., 1973).

Aussi, des concentrations millimolaires d'ammoniaque inhibent l'oxydation cérébrale du glucose *in vitro* (Mckhann et Tower., 1961) et l'incorporation de [¹⁴C]glucose dans les acides aminés du cerveau (glutamate, GABA, aspartate) est réduite chez les animaux hyperammoniémiques (Prior et Visek., 1972). De plus, il a été démontré que des concentrations d'ammoniaque de 0.5-1.0 mM inhibent l'activité de l' α -cétoglutarate déshydrogénase dans les préparations cérébrales (Lai et Cooper., 1986). Ces observations suggèrent que l'ammoniaque affecterait l'oxydation du glucose dans le cerveau. De fait, l'hyperammoniémie expérimentale a pour conséquence d'augmenter le rapport cérébral lactate/pyruvate (Hawkins et coll., 1973), et conduit aussi à une diminution du rapport de NAD^+/NADH dans le cytoplasme s'accompagnant d'une augmentation de ce rapport dans la mitochondrie. Il a été suggéré que ces altérations de l'état rédox sont la conséquence d'une inhibition induite par l'ammoniaque de la navette malate aspartate (Hindfelt et coll., 1977).

Bien que les concentrations d'ammoniaque rencontrées dans le cerveau lors d'une IHA soient capables d'inhiber l'activité de l' α -cétoglutarate déshydrogénase, il ne semble pas que l'IHA conduise à une altération des niveaux d'énergie, pour le

moins lors des stades précoces de l'encéphalopathie. Des mesures directes des phosphates à haute énergie dans le cerveau de rats ayant une IHA n'ont révélé aucune altération significative des niveaux d'ATP (Cooper et Plum., 1987). Ceci a été confirmé, plus tard, par spectroscopie de RMN au ^{31}P (Bates et coll., 1989).

6. HYPERTENSION INTRACRÂNIENNE LORS D'UNE INSUFFISANCE HÉPATIQUE AIGÜE

Un œdème cérébral et une hypertension intracrânienne (HTIC) sont observés chez 50% des patients atteints d'une IHA et qui présentent une EH. Le décès est causé par un engagement cérébral qui est la conséquence de l'HTIC (Ellis et Wendon., 1996). Les mécanismes physiopathologiques associés au développement de l'œdème cérébral lors d'une IHA sont incomplètement élucidés, mais des hypothèses récentes suggèrent une implication de troubles de l'osmorégulation et de la perfusion cérébrale (Blei et Larsen., 1999).

La pression intracrânienne (PIC) est la somme des pressions partielles des 3 composants non compressibles inclus dans la boîte crânienne, c'est-à-dire le parenchyme cérébral, le liquide céphalorachidien et les vaisseaux sanguins. Ainsi, si l'un des composants augmente de volume, un autre doit diminuer pour que la PIC reste stable. La faible compliance de la boîte crânienne explique que des variations de volume relativement faibles aboutissent à une augmentation marquée de la PIC. Lors d'une IHA on pense que ce sont le parenchyme cérébral et les vaisseaux sanguins qui sont à l'origine de l'HTIC, aboutissant à la mort par engagement cérébral.

Tous les facteurs influençant les mouvements d'eau au travers des capillaires cérébraux et influençant donc l'apparition d'un œdème cérébral ont été revus en détail

par Larsen et Wendon (2002) et sont basés sur des principes physiologiques émis par Ernest Starling. Selon l'équation de Starling, les mouvements d'eau au travers de la BHE dépendent non seulement du gradient de pression osmotique mais aussi du coefficient de filtration, de la surface capillaire totale et des variations du débit sanguin cérébral (DSC) (c'est-à-dire de la pression hydrostatique).

L'effet de l'IHA sur la surface capillaire totale et sur le coefficient de filtration n'est pas clair, mais des études indiquent que ces facteurs sont normaux, voire élevés, chez les patients ayant une insuffisance hépatique (Lockwood et coll., 1991a; Strauss et coll., 2001) suggérant donc qu'ils ne joueraient pas un rôle primordial dans l'étiologie de l'œdème cérébral.

6.1. Perturbations osmotiques cérébrales lors d'une IHA

L'œdème cérébral représente une augmentation nette de la teneur totale en eau du cerveau. Lors d'une IHA expérimentale (Traber et coll., 1987; Gove et coll., 1997), les astrocytes gonflent de manière sélective et semblent donc être le principal type cellulaire impliqué dans l'étiologie de l'œdème cérébral. Aussi, il est possible d'induire un gonflement des astrocytes isolés en les exposant à certaines des toxines circulantes lors d'une insuffisance hépatique (Norenberg., 1998).

Puisqu'une rupture de la BHE n'a jamais été mise en évidence lors d'une IHA après l'examen des capillaires cérébraux chez l'humain (Kato et coll., 1992) et dans des modèles expérimentaux (Traber et coll., 1987; Gove et coll., 1997); l'origine de l'augmentation de la teneur en eau des astrocytes doit être le fait de perturbations osmotiques causées par des changements de la concentration de métabolites dans le cerveau. Des mesures directes dans les modèles expérimentaux d'IHA (Cordoba.,

1996) et par spectroscopie de résonance magnétique chez l'humain (McConnell et coll., 1995) ont rapporté, de façon constante, une augmentation nette des niveaux de glutamine dans le cerveau. Or, la glutamine (qui est le produit majeur de détoxication de l'ammoniaque dans le cerveau) est une molécule osmotiquement active qui favorise l'œdème cellulaire. L'inhibition de la synthèse de glutamine prévient l'induction par l'ammoniaque du gonflement d'astrocytes isolés (Norenberg et Bender., 1994), et prévient aussi l'apparition de l'œdème cérébral *in vivo* (Takahashi et coll., 1991; Blei et coll., 1994).

6.2. Débit sanguin cérébral lors d'une IHA

Des perturbations osmotiques ne sont pas les seules responsables de l'entrée d'eau dans le cerveau lors d'une IHA. L'autre facteur capable d'influencer les mouvements d'eau au travers de la BHE est la pression hydrostatique, c'est-à-dire le débit sanguin cérébral.

Des études du DSC chez des patients ayant une IHA indiquent qu'une augmentation du DSC précède l'hypertension intracrânienne et l'engagement cérébral (Wendon et coll., 1994; Larsen et coll., 1996; Jalan et coll., 1999). Une augmentation du DSC aurait pour conséquence d'augmenter le mouvement d'eau au travers de la BHE. Cette hypothèse est supportée par l'observation d'une corrélation entre le DSC et la teneur en eau du cerveau et la PIC dans un modèle expérimental d'œdème cérébral induit par l'ammoniaque (Larsen et Wendon., 2002). Aussi, l'augmentation du DSC va augmenter le volume du compartiment sanguin qui vient s'ajouter à l'augmentation du volume cérébral (l'œdème) pour provoquer une augmentation de la PIC qui sera à l'origine de l'HTIC.

L'observation d'une augmentation du DSC lors d'une IHA est étonnante car normalement le DSC est étroitement lié à l'activité métabolique et que dans le cas d'une IHA on observe une diminution de l'activité mentale. L'influence de l'activité mentale sur le métabolisme et le DSC intéresse les physiologistes et les neurologistes depuis plus d'un siècle. Le cerveau possède un mécanisme intrinsèque par lequel l'apport de sang varie localement selon les variations locales de l'activité fonctionnelle. On fait référence à ce mécanisme comme étant le couplage ou l'autorégulation du DSC avec l'activité cérébrale (Larsen et coll., 1997).

Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer l'origine de l'augmentation du DSC lors d'une IHA; le premier étant une perturbation de l'autorégulation du DSC et le deuxième étant une diminution graduelle de la tonicité des artérioles cérébrales (Larsen et Wendon., 2002) qui seraient la conséquence de la toxicité de l'ammoniaque.

Les mécanismes moléculaires conduisant à la perte de l'autorégulation et/ou la vasodilatation des artérioles cérébrales ne sont pas connus mais des expériences utilisant des inhibiteurs de la synthèse de glutamine (Master et coll., 1999) et l'hypothermie (Cordoba et coll., 1999) ont permis de suggérer qu'un déséquilibre osmotique primaire cérébral serait à l'origine de l'augmentation de la perfusion cérébrale et de l'œdème cérébral. Il a aussi été suggéré que la réponse inflammatoire (Jalan et Williams., 2001; Jalan et coll., 2004b) pourrait jouer un rôle important dans l'altération du DSC.

7. TRAITEMENTS DE L'INSUFFISANCE HÉPATIQUE AIGÜE

La seule thérapie efficace pour traiter définitivement une IHA est une transplantation hépatique. Les taux de survie après transplantation atteignent une moyenne de 61-63% mais peuvent aller jusqu'à 93% selon les rapports (Ascher et coll., 1993; Detre et coll., 1994; Mirza et coll., 1995). Si on ne tient pas compte des IHA induites par une surdose d'acétaminophène, 45-51% des patients ayant une IHA sont transplantés (Munoz et coll., 1993; Castells et coll., 1993). Cependant 30% des patients meurent dans l'attente d'un donneur à cause d'un engagement cérébral dû à une hypertension intracrânienne incontrôlée (Jalan., 2003; Farmer et coll., 2003). Les taux de mortalité lorsqu'une transplantation hépatique n'est pas possible et que l'hypertension intracrânienne ne peut être contrôlée, sont de 90% (Jalan., 2003). Les thérapies disponibles visent donc le plus souvent à traiter les symptômes associés à l'IHA (l'HTIC en particulier) plutôt que de se concentrer sur la cause de l'IHA. Les cibles des traitements thérapeutiques incluent (1) l'ammoniaque et l'œdème cérébral ; (2) le DSC et le métabolisme ; (3) la réponse inflammatoire et (4) les traitements qui affectent plusieurs voies. Malgré la disponibilité de plusieurs traitements, le manque d'essais cliniques contrôlés rend difficile l'argumentation pour l'utilisation préférentielle d'une forme thérapeutique plutôt que les autres.

7.1. Stratégies de réduction de l'hyperammoniémie

Comme il l'a été démontré dans les sections précédentes, l'ammoniaque joue un rôle primordial dans l'étiologie de l'EH lors d'une IHA de même que dans l'étiologie de l'œdème cérébral et de l'HTIC, cependant les thérapies visant à réduire les niveaux d'ammoniaque circulant ne sont que peu utilisées.

7.1.1. Le lactulose, les acides aminés à chaîne latérale ramifiée et les antibiotiques non-absorbables

Aucune étude aléatoire contrôlée utilisant le lactulose, les acides aminés à chaîne latérale ramifiée ou des antibiotiques non-absorbables n'a été réalisée lors d'une IHA malgré que ces traitements se soient avérés efficaces afin de réduire les niveaux d'ammoniaque circulant lors d'une EH chronique. Une étude rétrospective menée aux USA n'a rapporté aucun bénéfice du traitement avec le lactulose de patients atteints d'une IHA (Jalan., 2003).

7.1.2. La L-Ornithine L-Aspartate

L'utilisation d'un mélange de deux acides aminés la L-Ornithine L-Aspartate (OA), afin de diminuer les taux d'ammoniaque chez les patients souffrant d'une IHA a été suggérée par les résultats d'une étude expérimentale utilisant un modèle animal d'IHA induite par une dévascularisation hépatique, dans lequel l'administration d'OA diminuait les niveaux d'ammoniaque plasmatique et prévenait l'apparition de l'œdème cérébral (Rose et coll., 1999). Malgré ces résultats encourageants et aussi le fait que ce médicament soit inoffensif, l'OA n'a jamais été utilisée chez l'humain lors d'une IHA.

7.2. Réduction de l'œdème cérébral

7.2.1. Solutions hypertoniques

Puisque la glutamine est un important intermédiaire métabolique chez l'homme (Master et coll., 1999), l'inhibition de sa synthèse qui prévient pourtant l'œdème cérébral dans l'IHA expérimentale, n'est pas envisageable chez l'humain.

L'infusion de solutions hypertoniques, que ce soit une solution de mannitol (Canalese et coll., 1982) ou une solution de chlorure de sodium (Murphy et coll., 2004), sont des traitements efficaces de l'augmentation de la PIC. Leur utilisation est basée sur le principe que le mannitol ou la solution hypertonique de chlorure de sodium conduisent à une augmentation de l'osmolalité des capillaires dans le cerveau. Ceci, selon la loi de Starling va entraîner un mouvement d'eau du cerveau vers les capillaires sanguins (Larsen et Wendon., 2002). Ce mouvement d'eau va réduire l'œdème cérébral et va par conséquent abaisser la PIC.

7.2.2. Antagoniste des récepteurs NMDA

L'utilisation d'antagonistes des récepteurs glutamatergiques de type NMDA est basée sur des données expérimentales obtenues avec la mémantine, un antagoniste non compétitif (Vogels et coll., 1997). Les auteurs de cette étude ont rapporté que l'administration de la mémantine à des rats ayant une hyperammoniémie aiguë, induite par une anastomose portocave suivie d'une perfusion d'acétate d'ammonium, conduisait à une diminution des niveaux de glutamate dans le LCR accompagnée par une réduction de l'œdème cérébral et par une amélioration de l'encéphalopathie. Néanmoins, aucun antagoniste des récepteurs NMDA n'a jamais été utilisé chez l'humain.

7.2.3. Anticonvulsant

L'utilisation de la phénytoïne qui est un anticonvulsant agissant sur la Na^+/K^+ ATPase, a été suggérée par une étude clinique contrôlée aléatoirement menée en 2000 et qui a rapporté une amélioration de l'œdème cérébral avec la phénytoïne sans pourtant avoir d'effet sur la PIC (Ellis et coll., 2000). Néanmoins, une étude clinique

contrôlée réalisée très récemment n'a rapporté aucun effet bénéfique de la phénytoïne sur l'œdème cérébral, sur les convulsions, sur le besoin d'induire une hyperventilation ou sur la survie lors d'une IHA (Bhatia et coll., 2004). Cependant, les auteurs ont admis que les patients inclus dans cette étude avaient été admis très tardivement et qu'il est possible qu'ils aient manqué la fenêtre thérapeutique.

7.3. Action sur le DSC et le métabolisme

7.3.1. L'hyperventilation

Les patients atteints d'une IHA présentent une perte de l'autorégulation du DSC contribuant à une vasodilatation cérébrale (Vaquero et coll., 2003). L'induction d'une hypocapnie artérielle par l'hyperventilation restaure l'autorégulation vasculaire cérébrale (Strauss et coll., 1998). Cependant, une étude clinique contrôlée n'a pu démontrer un effet significatif de l'hyperventilation sur l'œdème cérébral ainsi que sur l'engagement cérébral (Ede et coll., 1986).

7.3.2. La N-acétylcystéine

La N-acétylcystéine est normalement utilisée comme antidote de l'acétaminophène dans les 24 heures suivant une surdose. Des données suggèrent que la N-acétylcystéine serait aussi bénéfique pour des IHA qui ne sont pas induites par l'acétaminophène (Sklar et Subramaniam., 2004). Il semblerait que son utilisation soit bénéfique au niveau des microvaisseaux cérébraux, mais aucune donnée n'est disponible quant à son effet sur la survie.

7.3.3. L'indométhacine

L'indométhacine induit une vasoconstriction grâce à des mécanismes qui incluent une inhibition de la voie de la cyclo-oxygénase endothéliale, des altérations du pH extracellulaire et une réduction de la température cérébrale (Clark et Cumby., 1975; Feldberg et Saxena., 1975; Jensen et coll., 1992). Son utilisation réduit la PIC chez l'humain (Clemmesen et coll., 1997; Tofteng et Larsen., 2004) et dans un modèle expérimental d'IHA (Chung et coll., 2001).

7.4. Réponse inflammatoire systémique

De plus en plus d'évidences suggèrent que la réponse inflammatoire systémique est importante dans la pathogenèse de l'augmentation de la PIC lors d'une IHA. Il n'est pas encore clair si cette réponse inflammatoire est initiée par la libération de substances par le foie nécrotique ou si elle est due à une infection additionnelle (Rolando et coll., 2000; Jalan et Williams., 2001; Jalan et coll., 2002; Vaquero et coll., 2003).

7.4.1. La dexaméthasone

La dexaméthasone est un glucocorticoïde avec un effet anti-inflammatoire puissant. Son utilisation a été rapportée comme étant inefficace pour traiter l'œdème cérébral et améliorer le temps de survie (Canalese et coll., 1982).

7.4.2. L'hépatectomie

L'utilisation de l'hépatectomie pour les patients qui sont en attente d'une transplantation hépatique est une intervention dramatique mais qui peut être utilisée en dernier recours après que tous les traitements aient été employés et que l'état des

patients continue de se dégrader. La réalisation de l'hépatectomie est basée sur l'hypothèse que le foie nécrotique libère des substances qui vont contribuer à augmenter la pression intracrânienne. Deux études ont rapporté une amélioration de l'état des patients après hépatectomie (Ringe et coll., 1993; Jalan et coll., 2002). Il a été suggéré que l'effet de l'hépatectomie impliquait une réduction du DSC, de la production de NO et une réduction des niveaux de cytokines pro-inflammatoires dérivant du foie. L'hépatectomie semble donc être efficace pour prévenir l'augmentation de la PIC, mais il faut noter que dans le rapport de cas du Dr. Jalan en 2002, l'hépatectomie a induit une diminution de la température corporelle de 2 degrés Celsius, diminution qui a été démontrée comme étant capable de prévenir l'œdème cérébral dans des modèles expérimentaux d'IHA (Cordoba et coll., 1999; Rose et coll., 2000).

7.5. Action sur plusieurs voies métaboliques, l'hypothermie

Comme mentionné ci-dessus l'hypothermie modérée (35 °C) est capable de prévenir l'apparition de l'œdème cérébral lors d'une IHA expérimentale (Cordoba et coll., 1999; Rose et coll., 2000). D'autres groupes ont aussi montré qu'une hypothermie plus marquée (32-33 °C) conduisait à une réduction du contenu en eau du cerveau, une réduction des symptômes neurologiques et à une prolongation de la survie en comparaison avec les animaux normothermiques (Peignoux et coll., 1982; Traber et coll., 1989; Eguchi et coll., 1996).

Chez l'humain l'hypothermie est fréquemment utilisée chez des patients souffrant d'un traumatisme crânien (Clifton., 2004), et a été récemment utilisée efficacement chez l'humain pour traiter l'hypertension intracrânienne lors d'une IHA

(Jalan et coll., 1999; Jalan et coll., 2001; Jalan et coll., 2004a). Elle permet d'augmenter le temps de survie des patients jusqu'à ce qu'ils soient transplantés. Jalan et coll. ont très récemment proposé plusieurs mécanismes d'actions simultanés de l'hypothermie sur différents systèmes conduisant à une réduction de la PIC : (1) elle a des effets sur l'œdème cérébral via une diminution de la production de glutamine suite à des réductions concomitantes des niveaux d'ammoniaque artériel et de sa capture par le cerveau; (2) elle réduit le DSC; (3) elle atténue la production de cytokines pro-inflammatoires par le cerveau; (4) elle réduit le stress oxydatif (Jalan et coll., 2004a).

L'hypothermie est donc un traitement efficace de l'hypertension intracrânienne lors d'une IHA et permet de prolonger la survie des patients jusqu'à ce qu'un organe donneur soit disponible pour la transplantation. Cependant, malgré toutes les évidences obtenues chez l'humain ainsi que dans des modèles expérimentaux supportant son utilisation chez l'humain, l'hypothermie n'est utilisée que par quelques groupes dans le monde. D'autres études seront nécessaires pour identifier les mécanismes exacts de protection de l'hypothermie et aussi pour démontrer son innocuité chez l'humain.

8. BUT DES ÉTUDES

Comme nous l'avons vu précédemment, des perturbations du métabolisme cérébral du glucose, en particulier des élévations de la glutamine, semblent être à l'origine des manifestations neurologiques de l'IHA. Cette thèse avait donc pour but d'examiner, d'une part, les changements du métabolisme du glucose au cours du développement de l'EH et, d'autre part, d'examiner la capacité de synthèse de

glutamine dans le cerveau et les muscles squelettiques puisqu'elle devient la voie principale de détoxication de l'ammoniaque lors d'une IHA et que des évidences suggèrent que le cerveau, contrairement aux muscles, n'est pas capable d'augmenter la synthèse de glutamine afin d'accroître l'élimination de l'ammoniaque.

L'article 1 avait pour but d'examiner le rôle du lactate extracellulaire dans l'étiologie de l'œdème cérébral en utilisant l'hypothermie.

L'article 2 avait pour but de caractériser les taux d'incorporation de glucose dans les acides aminés et le lactate via les voies de synthèses neuronales et astrocytaires en utilisant la RMN de ^1H et ^{13}C .

L'article 3 a utilisé la RMN en combinaison avec l'hypothermie qui prévient l'apparition de l'œdème cérébral, afin d'examiner la corrélation entre les altérations du métabolisme cérébral du glucose et la présence de l'œdème cérébral.

Enfin, le but de l'article 4 était d'examiner si le cerveau et les muscles squelettiques étaient capables d'induire la GS afin d'augmenter leur capacité de synthèse de la glutamine et par conséquent d'augmenter l'élimination de l'ammoniaque.

CHAPITRE 2

ÉTUDES DU MÉTABOLISME CÉRÉBRAL ET MUSCULAIRE LORS D'UNE INSUFFISANCE HÉPATIQUE AIGUË : IMPLICATIONS POUR DE NOUVELLES STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES

1. ARTICLE 1:**MILD HYPOTHERMIA PREVENTS CEREBRAL EDEMA AND
CSF LACTATE ACCUMULATION IN ACUTE LIVER FAILURE.**

Metabolic Brain Disease, 16 (1/2), 2001.

Nicolas Chatauret, Christopher Rose, Guy Therrien, and Roger F. Butterworth,

Neuroscience Research Unit, CHUM (Hôpital Saint-Luc), Montréal, Québec, Canada
H2X 3J4.

ABSTRACT:

Evidence from both clinical and experimental studies demonstrate that mild hypothermia prevents encephalopathy and brain edema in acute liver failure (ALF). As part of a series of studies to elucidate the mechanism(s) involved in this protective effect, groups of rats with ALF resulting from hepatic devascularization were maintained at either 37°C (normothermic) or 35°C (hypothermic) and neurological status was monitored in relation to cerebrospinal fluid (CSF) concentrations of ammonia and lactate. CSF was removed via implanted cisterna magna catheters. Mild hypothermia resulted in a delay in onset of encephalopathy and prevention of brain edema; CSF concentrations of ammonia and lactate were concomitantly decreased. Blood ammonia concentrations, on the other hand, were not affected by hypothermia in ALF rats. These findings suggest that brain edema and encephalopathy in ALF are the consequence of ammonia-induced impairment of brain energy metabolism and open the way for magnetic resonance spectroscopic monitoring of cerebral function in ALF. Mild hypothermia could be beneficial in the prevention of severe encephalopathy and brain edema in patients with ALF awaiting liver transplantation.

INTRODUCTION

Hyperammonemia is a consistent finding in human acute liver failure (ALF) as well as in experimental animal models of ALF resulting from hepatectomy (Holmin et al., 1983), hepatic devascularization (Mans et al., 1994; Swain et al., 1992a,b) or toxic liver injury (Swain et al., 1992b) and, in all cases, severe encephalopathy and brain edema are observed. More recently, a positive correlation was reported between arterial ammonia concentrations and the incidence of brain herniation in patients with ALF (Clemmensen et al., 1999). Brain ammonia may reach concentrations in excess of 1mM in ALF (Swain et al., 1992a) and reduction of brain ammonia using agents such as L-ornithine L-aspartate are effective in the prevention of brain edema and encephalopathy in experimental ALF (Rose et al., 2000).

The mechanisms responsible for the deleterious effects of ammonia on brain function are not completely understood. However, two general mechanisms are currently the subject of intensive investigation, namely a compromise in brain energy metabolism and alterations of neurotransmitter function. In the case of energy metabolism, ammonia may potentially interfere with ATP synthesis by inhibition of the tricarboxylic acid cycle enzyme α -ketoglutarate dehydrogenase (Lai and Cooper, 1986) or by an NMDA receptor-mediated mechanism (Kosenko et al., 1994).

Hypothermia has been shown to extend the survival time and prevent brain edema in rats with acute hyperammonemia with or without liver failure (Schenker and Warren, 1961; Traber et al., 1989; Rose et al., 1999). Moreover, mild hypothermia is protective in experimental models of brain injury and stroke (Dietrich

et al., 1994; Busto et al., 1987). A previous report demonstrated a significant effect of mild hypothermia on blood-brain ammonia transfer leading to prevention of brain edema in rats with experimental ALF (Rose et al., 1999) and in patients with ALF awaiting liver transplantation (Jalan et al., 1999). The aim of the present study was to evaluate the effects of mild hypothermia in this context in relation to its effects on brain energy metabolism.

MATERIALS AND METHODS

Hepatic Devascularization

Adult male Sprague-Dawley rats weighing 175-200g were anesthetized with halothane and an end-to-side portacaval anastomosis (PCA) was performed according to the guidelines of Lee and Fisher (1961). Briefly, rats underwent a laparotomy and the inferior vena cava and portal vein were isolated allowing the inferior vena cava to be clamped (anastomosis clamp, Roboz Instruments Inc., Washington, D.C.), and an elliptical piece of vein 1.5 times the portal vein diameter to be removed. The portal vein was then ligated and cut, and an end-to-side anastomosis was performed under a dissecting microscope. Total surgery time was under 15 min. Overall mortality for shunted rats was less than 10%. Sham-operated control rats were matched for weight, anesthetized with halothane and a laparotomy was performed. The inferior vena cava and portal vein were clamped for 15 minutes, and then released. Following surgery, all animals were housed individually with free access to standard laboratory chow and water under controlled conditions of temperature, humidity, and light cycles. Forty-eight hours after PCA surgery, animals were reanesthetized with halothane and subjected to hepatic artery ligation (HAL) or laparotomy (controls) and

E-50 arterial catheters were inserted in the aorta to allow for blood sampling throughout the experiment.

CSF Removal

Cisterna magna catheters were installed as previously described (Swain et al., 1992b) in groups of animals, twenty-four hours after PCA or sham operation. Briefly, the animal's head was mounted with the skull in a horizontal position in a stereotaxic apparatus. A 3cm incision was made in the skin from the back of the head and the overlying connective tissue was removed to expose the skull. A small hole was drilled in the skull using a dental burr (009) on the midline immediately rostral to the interparietal-occipital bone suture. The hole was drilled in such a way that the occipital bone could be used as guideline while inserting the cannula (PE-10 tubing, Clay Adams, Parsipanny, NJ). The catheter was inserted into the cisterna magna. Correctness of placement was accompanied by a spontaneous flow of clear CSF. When successful implantation had been confirmed, the skull was cleaned and dried and dental acrylic cement (Yates and Bird, Chicago, IL) was applied to anchor the cannula.

Body Temperature and Blood Glucose Monitoring

Following the insertion of the cisterna magna catheter, body temperatures were monitored and maintained at 37°C by means of heating lamps (the ALF-37°C group). In the ALF-35 group hypothermia occurred spontaneously in the absence of external heating. Body temperatures in this group of animals were maintained at 35°C by intermittent warming with heating lamps as necessary. Arterial blood

glucose levels were monitored and glucose was administered subcutaneously as needed to maintain normoglycemia.

Neurological Evaluation

Animals were assessed neurologically every 30 min during the progression of ALF. Animals that could no longer right themselves after being placed on their backs were considered to have lost their righting ability (defined as the precoma stage); animals in which both righting ability and a corneal reflex could not be elicited were considered to be in coma. Samples for lactate analysis in cisternal CSF were taken before HAL, 5 hours after HAL, and at precoma and coma stages of encephalopathy. At the end of the experiment (1h in coma stage), animals were sacrificed and the brains were removed. Half the brain was frozen and stained with cresyl violet for neuropathological verification of probe placement. The frontal cortex of the other half of the brain was used for brain water measurement. CSF and blood ammonia samples were taken at baseline (following HAL) and at precoma and coma stages. Animals were sacrificed at the end of the experiment. All animals received humane care according to the criteria outlined in the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health (NIH publication 6-23 revised 1985).

Brain Water Measurement

One cerebral hemisphere was kept at 4°C and brain water measured at coma stages of encephalopathy. The brain was cut into 2mm slices, and 1mm punch biopsy specimens were obtained from the gray matter of the cerebral cortex. Water content

of each specimen was measured gravimetrically using a density gradient of bromobenzene-kerosene precalibrated with K_2SO_4 as previously described (Swain et al., 1992b). The cortical samples were placed onto the fluid column, and the equilibration point was measured within 2 min. The specific gravity of the tissue was calculated and results were expressed as percentage of water content. Eight measurements were made per animal, and values were arithmetically averaged.

Ammonia

Ammonia concentrations were estimated in plasma and CSF using a commercial ammonia test kit.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean \pm S.E.M. from 8 animals per treatment group. Differences between groups (ALF-35, ALF-37, Sham) at the same time point were compared by one-way ANOVA (Bonferoni's correction), and differences within groups at different time points were compared by means of one-way ANOVA with repeated measures (Bonferoni's correction). P values of $0 < 0.05$ were considered to be significant.

RESULTS

Following PCA and HAL, normothermic rats (ALF-37 group) developed progressive encephalopathy consisting of loss of activity, loss of righting ability (precoma stage) progressing to loss of corneal reflex (coma stage). ALF-37 rats developed pre-coma at 8.1 ± 0.8 h and coma at 13.4 ± 1.1 h. Mild hypothermia (35°C)

afforded complete protection against hepatic encephalopathy in rats with ALF (ALF-35 group) as previously described (Rose et al., 2000). Thus at times at which the ALF-37 rats were comatose, none of the ALF-35 rats had developed significant neurological symptoms. Hypothermic rats eventually became comatose at 18.3 ± 1.1 h post HAL. This protective effect was observed in 8/8 rats in the ALF-35 group. No rats in the sham-operated groups developed neurological symptoms.

Both ALF-37 and ALF-35 groups of rats developed hyperammonemia. However plasma ammonia levels were not significantly different between the ALF-37 and ALF-35 groups at any time point studied (Table 1). CSF ammonia concentrations, on the other hand, were significantly less (by 34%, $p < 0.01$) in rats from the ALF-35 group ($672 \pm 73 \mu\text{g/dl}$) compared to those in ALF-37 group at coma stages of encephalopathy ($1007 \pm 78 \mu\text{g/dl}$) (Table 1). There was also a significant difference ($p < 0.01$) in CSF ammonia between the two groups at pre-coma stages; ALF-35, $557 \pm 40 \mu\text{g/dl}$ vs ALF-37, $838 \pm 32 \mu\text{g/dl}$. These data were previously published (Rose et al., 2000).

Table 1: Plasma and CSF Ammonia in ALF.

Treatment group	Ammonia Concentrations ($\mu\text{g/dL}$)		
	Baseline	Precoma	Coma
Plasma			
Sham	62.0 ± 10.9	41.4 ± 11.3	64.7 ± 9.5
ALF-37	$129 \pm 10.9^*$	$511.7 \pm 27.6^{**}$	$640 \pm 33.8^{**}$
ALF-35	$161.8 \pm 28.1^*$	$455.4 \pm 41.5^{**}$	$585.7 \pm 34.2^{**}$
CSF			
Sham	49.6 ± 10.2	64.4 ± 11.3	52.4 ± 9.5
ALF-37	73.6 ± 25.3	$837 \pm 31.5^*$	$1007.3 \pm 77.8^{**}$
ALF-35	77.2 ± 28	$556.1 \pm 39.6^{**\dagger}$	$671 \pm 72.8^{**\dagger}$

Note: Values significantly different from sham operated controls at each time point are indicated by * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ by ANOVA. Values significantly different from ALF-37 at a given time point are indicated by † $p < 0.05$.

Normothermic rats with ALF manifested an increase in brain water content whereas mild hypothermia led to a significant attenuation of this increase (sham, 80.22%; ALF-37, 81.74%; ALF-35, 80.48%, $p < 0.01$ compared to ALF-37 group) (Table 2).

Table 2: Brain Water Content.

Parameter	Sham ($n=8$)	ALF-37 ($n=8$)	ALF-35 ($n=8$)
% Brain water	80.22 ± 0.12	$81.7 \pm 0.13^*$	$80.48 \pm 0.15^\dagger$

Note: Values significantly different from sham-operated controls are indicated by * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ and values significantly different from the normothermic group are indicated by † $p < 0.001$, by ANOVA.

Mild hypothermia significantly reduced the lactate accumulation in CSF (Figure 1).

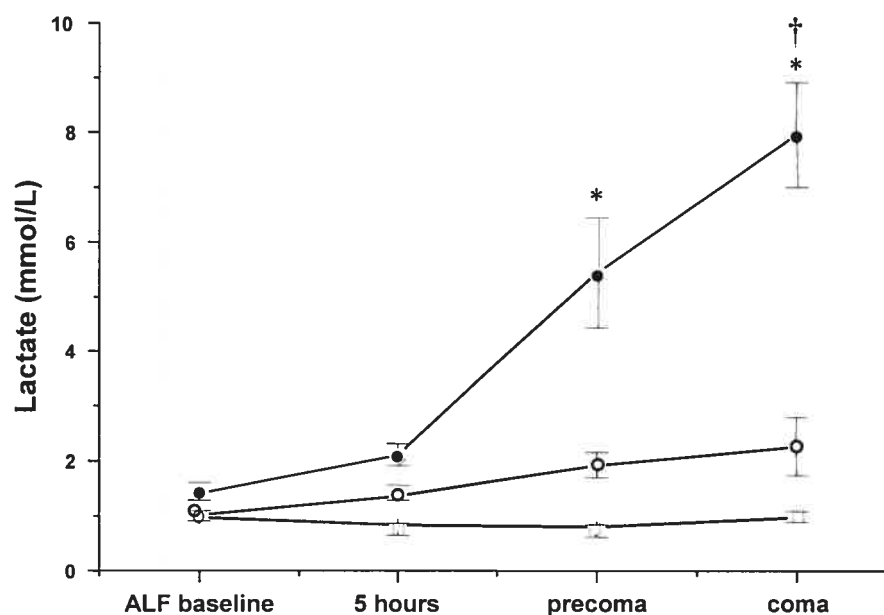


Figure 1: Prevention of the increase in CSF lactate by mild hypothermia in rats with ALF due to hepatic devascularization.

Groups of ALF rats were maintained at 37°C (normothermic) (●) or 35°C (hypothermic) (○) and lactate concentrations were measured in cisternal CSF at various stages during the development of severe encephalopathy. Precoma stage defined as time at which animals lost their righting ability; coma stage: loss of corneal reflex. Values significantly different from sham-operated controls (□) indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Analysis of variance and post-hoc Tukey test. Symbols indicated mean values \pm S.E.

DISCUSSION

Results of the present study confirm and extend previous studies (Traber et al., 1989; Rose et al., 2000) demonstrating that mild hypothermia delays the time of onset of hepatic encephalopathy and prevents brain edema in rats with ALF.

Following hepatic devascularization, blood ammonia levels rise to attain levels in the 200 to 500 $\mu\text{g/dl}$ range (Swain et al., 1992a). Similar blood ammonia increases have been reported in patients with acute liver failure who developed brain herniation (Clemmensen et al., 1999). Hypothermia was also previously shown to

prevent the central nervous system consequences of pure hyperammonemia in the absence of liver disease (Schenker and Warren, 1962).

Within hours of hepatic devascularization in the rat, brain ammonia concentrations are increased and these increases parallel the severity of encephalopathy and appearance of brain edema (Swain et al., 1992a). It has been proposed that ammonia toxicity is (directly or indirectly) the cause of brain edema in this model of ALF (Cordoba and Blei, 1996). However, findings from the present study reveal that the beneficial effects of hypothermia are not mediated by a direct effect on blood ammonia. On the other hand, CSF ammonia concentrations were significantly reduced in hypothermic rats at times following hepatic devascularization when blood ammonia concentrations were unchanged. These findings suggest that one of the mechanisms responsible for the protective action of mild hypothermia in ALF is reduced blood-brain ammonia transfer.

The finding, in the present study, of a significant prevention of the increased lactate in CSF due to mild hypothermia, suggests a role for impaired brain energy metabolism in the pathogenesis of HE and brain edema in ALF. Increases in brain lactate are a consistent finding in acute liver failure (Hawkins et al., 1973; Holmin et al., 1983; Therrien et al., 1991). Preliminary studies from our Unit suggest that the increased lactate production in brain in ALF is a consequence of increased expression of lactate dehydrogenase (unpublished data). Furthermore, EEG changes were reported to parallel increases in brain lactate in ALF (Deutz et al., 1988) suggesting that impaired brain energy metabolism underlies the pathogenesis of encephalopathy. Results of the present study are consistent with this possibility since hypothermia

prevented the rise in CSF lactate and caused a significant delay in onset of encephalopathy in ALF.

It is unlikely that the increase in CSF lactate in ALF is the result of increased blood levels of the metabolite since Alexander et al. (1962) were unable to observe any significant increase in CSF lactate following its intravenous administration. Furthermore, Posner and Plum (1961) reported an independence of blood and CSF lactate in a range of neurological disorders. It is therefore likely that the increase in CSF lactate observed in the present study in ALF is the consequence of intrinsic cellular metabolic changes. In this regard, it is well established that both ammonia toxicity and liver failure are associated with decreased cerebral oxygen consumption (Fazekas et al., 1956; McKann and Tower, 1961). Moreover, ammonia inhibits cerebral oxidative metabolism *in vitro* by an inhibitory action on the tricarboxylic acid cycle enzyme α -ketoglutarate dehydrogenase (Lai and Cooper, 1986). More recently, it was proposed that ammonia exposure also results in impaired cerebral energy metabolism via a mechanism involving NMDA receptor activation (Kosenko et al., 1994). Whatever the mechanism, the rise in brain lactate in ALF probably reflects an impairment of brain energy metabolism caused by exposure to ammonia, a phenomenon which has been recognized for over 40 years (Schenker and Warren, 1962; McKann and Tower, 1961).

It is unclear to what extent increases in brain lactate may contribute to the pathogenesis of brain edema in ALF. Exposure of cultured astrocytes to lactate results in significant cell swelling (Staub et al., 1990) and results of the present study reveal that CSF lactate increases are maximal at coma stages of encephalopathy in

ALF, a time at which brain edema is maximal. Furthermore, mild hypothermia prevents both brain edema and the accumulation of lactate in CSF in ALF. On the other hand, increased brain lactate is a feature which is common to both acute (Hawkins et al., 1973; Holmin et al., 1983) and chronic (Hindfelt et al., 1977; Therrien et al., 1991; Yao et al., 1987) liver failure and brain edema in generally confined to the acute condition. It is conceivable that compensatory mechanisms occur in chronic liver failure which render the astrocytes less vulnerable to lactate-induced swelling. Further studies are required in order to assess this possibility.

In conclusion, mild hypothermia prevents brain edema and delays the onset of severe encephalopathy in experimental ALF. This protective effect of mild hypothermia is accompanied by a decrease in CSF ammonia and a concomitant reduction in CSF lactate. These findings are consistent with an effect of mild hypothermia on cerebral energy metabolism. Further studies using ¹H-Magnetic Resonance Spectroscopy would be useful in assessing the relationship between brain lactate accumulation and severity of encephalopathy and brain edema in patients with ALF.

ACKNOWLEDGMENTS

These studies were funded by a grant from CIHR (Canada). We thank Dominique D. Roy for her assistance with the preparation of the manuscript.

REFERENCES

Alexander S.C., Workman R.D. and Lambertsen C.J. (1962). Hyperthermia, lactic acid infusion, and the composition of arterial blood and cerebrospinal fluid. *Am. J. Physiol.* **202**: 1049-1054.

Busto R., Globus M.Y.T., Dietrich W.D., Martinez E., Valdes I., Ginsberg M.D. (1989). Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke* **20**: 904-910.

Clemmensen J.O., Larsen F.S., Kondrup J., Hansen B.A., Ott P. (1999). Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology* **29**: 648-63.

Cordoba J. and Blei A.T. (1996). Brain edema and hepatic encephalopathy. *Semin. Liver Dis.* **16**: 271-280.

Deutz N.E.P., De Graaf A.A., De Haan, J.G., Bovée w.M.M.J., Chamuleau r.A.F.M. *In vivo* brain ¹H-NMR spectroscopy (¹H-NMRS) during acute hepatic encephalopathy (HE). In (P.B. Soeters, J.H.P. Wilson, A.J. Meijer and E. Holm, eds) *Advances in Ammonia Metabolism and Hepatic Encephalopathy*. Excerpta Medica, Amsterdam 1988, Chapter 57, 439-446.

Dietrich W.D., Alonso O., Busto R., Globus M.Y.T., Ginsberg M.D. (1994). Post-traumatic brain edema hypothermia reduces histopathological damage following concussive brain injury in the rat. *Acta Neuropathol.* **87**: 250-258.

Fazekas J.F., Ticktim H.E., Ehrmantraut W.R., Alman R.W. (1956). Cerebral metabolism in hepatic insufficiency. *Am. J. Med.* **21**: 843.

Hawkins R.A., Miller A.L., Nielsen R.C., Veech R.L. (1973). The acute action of ammonia on rat brain metabolism *in vivo*. *Biochem. J.* **134**, 1001-1008.

Hindfelt B., Plum F. and Duffy T.E. (1977). Effects of acute ammonia intoxication on cerebral metabolism in rats with portacaval shunts. *J. Clin. Invest.* **59**: 386-396.

Holmin T., Agardh C.D., Alinder G., Herlin P., Hultberg B. (1983). The influence of total hepatectomy on cerebral energy state, ammonia-related amino acids of the brain and plasma amino acids in the rat. *Eur. J. Clin. Invest.* **13**: 215-220.

Jalan R., Dalmink S.W.M. Olde, Lee A., Hayes P.C. (1999). Moderate hypothermia for uncontrolled intracranial hypertension in acute liver failure. *Lancet* **354**: 1164-1168.

Kosenko E., Kaminsky Y., Grau E., Minana M.D., Marcaida G., Grisolia S., Felipo V. (1994). Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na⁺, K⁺-ATPase. *J. Neurochem.* **63**: 2172-2178.

Lai J.C.K. and Cooper A.J.L. (1986). Alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution and effects of inhibitors. *J. Neurochem.* **47**: 1376-1386.

Lee S., and Fisher B. (1961). Portacaval shunt in the rat. *Surgery* **50**: 668-672.

Mans A.M., DeJoseph R., Hawkins R.A. (1994). Metabolic abnormalities and grade of encephalopathy in acute liver failure. *J. Neurochem.* **63**: 1829-1838.

McKhann G.M. and Tower D.B. (1961). Ammonia toxicity and cerebral oxidative metabolism. *Am. J. Med.* **200**: 420.

Posner J.B. and Plum F. (1967). Independence of blood and cerebrospinal fluid lactate. *Arch. Neurol.* **16**: 492-496.

Rose, C., Michalak, A., Rama Rao, K.V., Quack, G., Kircheis, G. and Butterworth, R.F. (1999). L-Ornithine-L-Aspartate lowers plasma and cerebrospinal fluid ammonia and prevents brain edema in rats with acute liver failure. *Hepatology* **30**: 636-640.

Rose, C, Michalak, A., Pannunzio, M., Chatauret, N., Rambaldi, A. and Butterworth, R.F. (2000). Mild hypothermia delays the onset of coma and prevents brain edema and extracellular brain glutamate accumulation in rats with acute liver failure. *Hepatology* **31**; 872-877.

Schenker S. and Warren K.S. (1962). Effect of temperature variation on toxicity and metabolism of ammonia in mice. *J. Lab. Clin. Med.* **60**: 291-301.

Staub F., Baethmann A., Peters J., Weigt H. and Kempfski O. (1990). Effects of lactacidosis on glial cell volume and viability. *J. Cerebr. Blood Flow and Metab.* **10**: 866-876.

Swain M., Butterworth R.F., Blei A.T. (1992a). Ammonia and related amino acids in the pathogenesis of brain edema in acute ischemic liver failure in rats. *Hepatology* **15**: 449-453

Swain M., Bergeron M., Audet R., Blei A.T. Butterworth R.F. (1992b). Monitoring of neurotransmitter amino acids by means of an indwelling cisterna magna catheter: A comparison of two rodent models of fulminant hepatic failure. *Hepatology* **16**: 1028-1035.

Therrien G., Giguère J.-F., Butterworth R.F. (1991). Increased cerebrospinal fluid lactate reflects deterioration of neurological status in experimental portal-systemic encephalopathy. *Metab. Brain Dis.* **6**: 225-231.

Traber P., DalCanto M., Ganger D., Blei A.T. (1989). Effect of body temperature on brain edema and encephalopathy in the rat after hepatic devascularization. *Gastroentology* **96**: 885-891.

Yao H., Sadoshima S., Fujii D., Kusada K., ishitsuka T., Tamaki K., Fujishima M. (1987). Cerebrospinal fluid lactate in patients with hepatic encephalopathy. *Eur. Neurol.* **27**: 182-187.

2. ARTICLE 2:**SELECTIVE INCREASE OF BRAIN LACTATE SYNTHESIS IN
EXPERIMENTAL ACUTE LIVER FAILURE: RESULTS OF A [¹H-
¹³C] NMR STUDY.**

Hepatology, 37, 2003.

Claudia Zwingmann^{1,2}, Nicolas Chatauret¹, Dieter Leibfritz², Roger F. Butterworth¹.

¹Neuroscience Research Unit, CHUM (Hôpital Saint-Luc), Montréal, Québec,
Canada H2X 3J4.

²Department of Organic Chemistry, University of Bremen, Bremen, Germany

ABSTRACT

Acute liver failure (ALF) results in alterations of energy metabolites and of glucose-derived amino acid neurotransmitters in brain. However, the dynamics of changes in glucose metabolism remain unclear. The present study was undertaken using ^1H - and ^{13}C NMR to determine the rates of incorporation of glucose into amino acids and lactate via cell-specific pathways in relation to the severity of encephalopathy and brain edema in rats with ALF due to hepatic devascularization. Early (precoma) stages of encephalopathy were accompanied by significant 2- to 4.5 fold ($p < 0.001$) increases of total brain glutamine and lactate concentrations. More severe (coma) stages of encephalopathy and brain edema led to a further significant increase in brain lactate but no such increase in glutamine. Furthermore, ^{13}C isotopomer analysis showed a selective increase of *de novo* synthesis of lactate from $[1-^{13}\text{C}]$ glucose resulting in 2.5-fold increased fractional ^{13}C -enrichments in lactate at coma stages. $[2-^{13}\text{C}]$ glutamine, synthesized through the astrocytic enzyme pyruvate carboxylase increased 10-fold at precoma stages but showed no further increase at coma stages of encephalopathy. ^{13}C -label incorporation into $[4-^{13}\text{C}]$ glutamate, synthesized mainly through neuronal pyruvate dehydrogenase, was selectively reduced at coma stages, whereas brain GABA synthesis was unchanged at all time points. In conclusions, increased brain lactate synthesis and impaired glucose oxidative pathways rather than intracellular glutamine accumulation are the major cause of brain edema in ALF. Future NMR spectroscopic studies using stable isotopes and real-time measurements of metabolic rates could be valuable in the elucidation of the cerebral metabolic consequences of ALF in humans.

INTRODUCTION

Hepatic Encephalopathy (HE) and brain edema are serious central nervous system complications of acute liver failure (ALF) which are accompanied by significant alterations of brain metabolites. For example, biochemical studies in brain tissue from animals with ALF resulting from hepatectomy (Holmin et al., 1983), hepatic devascularization (Swain et al., 1992a; Mans et al., 1994; Michalak et al., 1996) or toxic liver injury (Peeling et al., 1993) as well as autopsied brain tissue from patients with ALF (Record et al., 1976) reveal significant increases in concentrations of glutamine and a concomitant reduction of glutamate. Several of these studies also show that brain lactate concentrations are elevated as a function of the deterioration of central nervous system function in ALF, a finding which has been attributed to decreased pyruvate oxidation due to ammonia exposure (Lai et al., 1986). While these biochemical studies provide important hints on metabolic derangements in ALF, they do not permit the elucidation of rates of synthesis/degradation of these metabolites nor do they provide information on the cellular localization of the altered metabolism. The use of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy and stable isotope precursors provides an effective approach to the study of metabolic turnover in the brain. In particular, ^{13}C -NMR, which detects ^{13}C -label in specific carbon positions of individual compounds and allows the simultaneous calculation of metabolite concentrations and metabolic fluxes, may be used to track cellular metabolism and intercellular trafficking of substrates in a comprehensive and non-invasive manner (Gruetter et al., 1992; Gruetter et al., 1994; Sibson et al., 1997). This technique has been used to determine the relative fluxes via glycolytic and tricarboxylic acid cycle (TCA) pathways as well as to estimate neuronal versus

astrocytic metabolism in a "one-step" procedure (Cerdan et al., 1990; Bachelard et al., 1993; Brand et al., 1998; Pfeuffer et al., 1998). The present study makes use of a combination of ^{13}C - and ^1H -NMR in order to assess ^{13}C -glucose incorporation into metabolites in rat brain using an ex vivo approach at various stages during the development of ALF due to hepatic devascularization.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animal model of acute liver failure (ALF)/surgical procedures

ALF was induced in adult Sprague-Dawley rats (175-200 g) by portacaval anastomosis (PCA) according to the guidelines of Lee and Fischer (Lee et al., 1961) followed by hepatic artery ligation (HAL). In brief, rats were anesthetized with halothane, the inferior vena cava and portal vein were isolated, the inferior vena cava was partially clamped (anastomosis clamp, Roboz Instruments Inc.), and an elliptical piece of vein 1.5 times the portal vein diameter was removed. The portal vein was ligated and cut, and an end-to-side anastomosis performed under a dissecting microscope. Total surgery time was < 15 min. Sham-operated control rats, matched for weight, were similarly anesthetized, a laparotomy was performed, and the inferior vena cava and portal vein were occluded for 15 min. Following surgery, all animals were housed individually under constant conditions of temperature, humidity, and light cycles and were allowed free access to standard laboratory chow and water. Overall mortality for shunted rats was less than 5%. 48 hours after PCA surgery, animals were reanesthetized with halothane and subjected to hepatic artery ligation (HAL) or laparotomy (controls). Following HAL, body temperatures were monitored every hour and maintained at 37 °C by means of thermal pads and heating lamps.

Animals were assessed neurologically every 30 min during progression of ALF. Animals that could no longer right themselves after being placed on their backs were considered to have lost their righting ability (defined as the precoma stage); animals in which both righting ability and corneal reflex could not be elicited were considered to be in coma. All animals received humane care according to the criteria outlined in the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health (NIH publication 6-23 (revised), 1985).

Preparation of brain extracts

Administration of [1-¹³C]glucose. Groups of sham-operated control rats, and hepatic devascularized rats at precoma- and coma stages of encephalopathy were administered [1-¹³C]glucose (200 mg/kg, i.p.; Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA) and were killed exactly 15 min later by decapitation. After HAL, arterial blood glucose levels were continuously monitored with a glucose meter using the glucose dehydrogenase method and glucose was administered subcutaneously as needed to maintain normoglycemia. Plasma glucose levels and the fractional enrichments in glucose ($[1-^{13}\text{C}]/[^{12}\text{C}]$ glucose) were also determined from ¹H- and ¹³C-NMR spectra (Table 1).

Extraction procedure. Immediately after sacrifice, blood samples were mixed with 20% perchloric acid (PA), and stored at -80 °C. Forebrains (whole brain minus cerebellum and brainstem) were snap-frozen in liquid nitrogen, powdered over liquid nitrogen, and homogenized in 15 ml of a 12% PA solution at 0 °C using a motor-driven polished glass tube-Teflon pestle homogenizer. The homogenate and the blood

samples were centrifuged at 40,000 g for 15 min; the supernatants were placed in an ice bath, and neutralized to pH = 7.0 with KOH. The precipitated KClO_4 was sedimented by centrifugation (40,000 g for 15 min), and supernatants were lyophilized.

Brain water

Water content of the brain samples was measured gravimetrically using a density gradient of bromobenzene-kerosene precalibrated with K_2SO_4 as previously described (Marmarou et al., 1978). The results were expressed as percentage of water content. Eight measurements were made per animal, and values were arithmetically averaged.

Ammonia concentration

Plasma ammonia concentrations were estimated using a commercial ammonia test kit, which uses an ion-exchange method, followed by colorimetric measurement of ammonia nitrogen with the Bertholet phenate-hypochlorate reaction (Dienst., 1961).

NMR spectroscopy

The lyophilized PA extracts of brain tissue and blood plasma were redissolved in 0.6-0.8 ml deuterium oxide (D_2O) and centrifuged. Prior to the NMR analysis the pH was adjusted to 7.0 with deuterium chloride (DCl) and NaOD. ^1H - and ^{13}C -NMR spectra were recorded on Bruker DRX 600 or AMX 360/AM 360 spectrometers,

operating at frequencies of 600 MHz or 360 MHz for ^1H -, and 150.9 MHz or 90.5 MHz for ^{13}C -measurements.

^1H -NMR spectra were recorded with a 5-mm H,C,N inverse triple resonance probe, 400 accumulations, repetition time 15 s, spectral width 7183 Hz (DRX 600) or 3623 Hz (AM/AMX 360), data size 16 K, zero filling to 32 K. Chemical shifts were referenced to lactate at 1.33 ppm.

^{13}C -NMR spectra were recorded with a 5-mm $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ dual probe, 10,000 accumulations, repetition time 2.5 s, composite pulse decoupling with WALTZ-16, spectral width 47,619 Hz (DRX 600) or 20,833 Hz (AM/AMX 360), data size 32 K (16 K), zero filling to 64 K (32 K). Chemical shifts were referenced to the C-3 signal of lactate at 21.3 ppm.

Quantification of metabolite concentrations

Lactate concentrations were determined enzymatically (adapted for measurement in 96-well microtiter ELISA plates) using a commercially available kit according to the recommendations of the supplier (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). The concentrations ($\mu\text{mol/g}$ tissue) of other unlabelled metabolites and their pool sizes ($[^{13}\text{C}] + [^{12}\text{C}]$) were determined from fully relaxed ^1H -NMR spectra of blood and brain extracts, obtained after injection of $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ glucose or equivalent amounts of unlabelled glucose, using 3-trimethylsilyl-[2,2,3,3- $^2\text{H}_4$]propionic acid (TSP) as an external standard or using known lactate concentrations as internal standard.

Calculation of fractional ^{13}C -enrichments

The ratio of [$3\text{-}^{13}\text{C}$]lactate to the concentration of unlabelled lactate (tracer-tracee ratio or "fractional ^{13}C -enrichment") was calculated from ^1H -NMR spectra by integration of peak areas of both $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ satellite signals and the $^1\text{H}\text{-}^{12}\text{C}$ signal (unlabelled lactate) of the methyl groups (Fig. 1):

$$\text{fractional } ^{13}\text{C}\text{-enrichment} = \frac{\text{area } (^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C})}{\text{area } (^1\text{H}\text{-}^{12}\text{C})} \times 100 \quad (1)$$

The sum (area ($^1\text{H}\text{-}^{12}\text{C}$) + area ($^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$)) is equivalent to the pool size of lactate, measured enzymatically. The values were corrected for 1.1 % natural abundance ^{13}C in unlabelled lactate. ^{13}C in [$1\text{-}^{13}\text{C}$]glucose was calculated in the same way using the H1 α glucose resonances in ^1H -NMR spectra. The fractional ^{13}C -enrichment of each carbon of other metabolites is derived from peak area ratio of the ^{13}C -labelled carbon/natural abundance carbon (Badar-Goffer et al., 1991):

$$E_{\text{Met}} (\%) = \frac{A_{\text{Met}} - A_{\text{n.a.}} (\text{Met})}{A_{\text{n.a.}} (\text{Met})} \times 100 \quad (2)$$

In the equation, A_{Met} represents the ^{13}C carbon peak area of the metabolite of interest, and $A_{\text{n.a.}}$ the signal intensity due to natural abundance ^{13}C in the unlabelled metabolite. The ^{13}C signal intensities were corrected for NOE (Nuclear Overhauser Enhancement) and naturally abundant ^{13}C (1.1%) in the ^{13}C -labelled metabolite. The natural abundance ^{13}C contributing from the unlabelled metabolite to the total

intensity ($A_{n.a.}(\text{Met})$) was determined using the known ^{13}C -enrichment and natural abundance of lactate as internal standard by conversion of equation 2 for E_{Lac} and relation to the concentrations of the unlabelled metabolites determined from $^1\text{H-NMR}$ spectra:

$$A_{n.a.}(\text{Met}) = \frac{A_{\text{Lac}} \cdot [\text{Met}]}{(E_{\text{Lac}} + 1) \cdot [\text{Lac}]} \quad (3)$$

In the equation, A_{Lac} represents carbon peak area of lactate, $[\text{Lac}]$ or $[\text{Met}]$ the concentrations of unlabelled lactate and the metabolite of interest, respectively, and E_{Lac} the fractional ^{13}C -enrichment of lactate. The absolute amount of ^{13}C in a specified carbon position (absolute synthesis from $[1-^{13}\text{C}]\text{glucose}$; mmol/g wet weight) is the product of the unlabelled metabolite (mmol/g wet weight) times the fractional ^{13}C -enrichment.

Statistical analysis

The NMR studies were carried out on groups of eight hepatic devascularized rats, four rats at coma stage of encephalopathy and four rats at precoma stage, and on four sham-operated controls. Data are expressed as mean \pm SD values obtained from the indicated number of rats. Data between individual groups were analyzed using ANOVA and post-hoc Tukey's test. Differences were considered significant when $p < 0.05$ (\dagger significantly different from sham-operated controls; \ddagger significantly different at coma versus precoma stages; $*** p < 0.001$; $** p < 0.01$, $* p < 0.05$).

RESULTS

Ammonia concentrations and brain water content

Rats with ALF manifested 10-fold increased plasma ammonia concentrations (512.2 ± 29.6 and 638.2 ± 34.8 $\mu\text{g/dl}$ at precoma and coma stages, respectively). Brain edema was evident in rats at coma stages showing an increase of brain water content to 81.74% compared to sham-operated controls (80.22%) ($P < 0.01$).

Brain and plasma glucose concentrations

Table 1 shows the arterial glucose concentrations determined immediately before and 15 min after injection of $[1-^{13}\text{C}]$ glucose. Neither total glucose levels nor fractional ^{13}C -enrichments in plasma glucose were significantly different in the three experimental groups.

Table 1: Concentration and fractional ^{13}C -enrichment in plasma $[1-^{13}\text{C}]$ glucose.

	Total concentration ($\mu\text{mol/L}$)		
	Before injection of $[1-^{13}\text{C}]$ Glucose T = 0	After injection of $[1-^{13}\text{C}]$ Glucose T = 15 min	Fractional ^{13}C Enrichment T = 15 min
Sham	6.39 ± 0.40	6.78 ± 0.33	23.21 ± 1.71
Precoma	6.59 ± 0.48	6.33 ± 0.47	24.74 ± 2.62
Coma	6.66 ± 0.67	6.26 ± 0.49	25.91 ± 2.94

Note: The concentrations and fractional ^{13}C -enrichments in arterial $[1-^{13}\text{C}]$ glucose ($[^{13}\text{C}]/[^{12}\text{C}]$) were obtained by the glucose oxidase method and by integration of the respective signals in ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra of blood plasma extracts obtained from sham-operated controls, and from rats with ALF at precoma- and coma stages. Values represent means \pm SD for $n = 4-8$. The differences between the experimental groups were not significant.

Changes in lactate and amino acid concentrations in plasma and brain of rats with ALF in relation to the severity of encephalopathy and brain edema

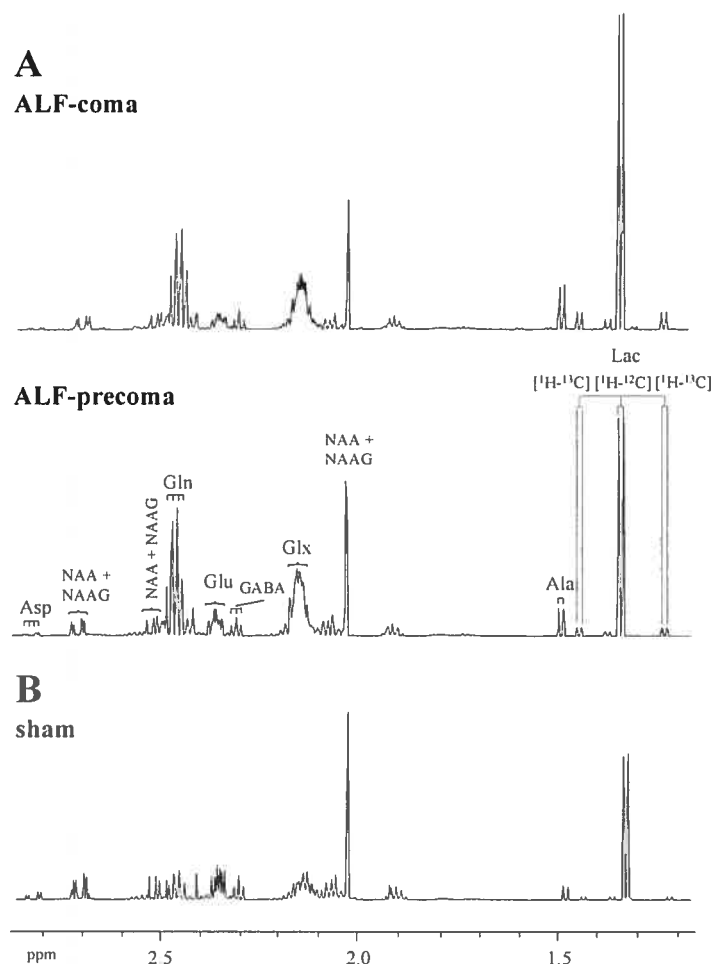


Figure 1: ¹H-NMR spectra of brain extracts.

Segments of ¹H-NMR spectra of brain extracts obtained from a sham-operated control, and from rats with ALF at precoma- and coma stages. Peak assignments: Ala, alanine; Lac, lactate (¹H-¹²C) and (¹H-¹³C) (the large doublet splitting, J = 128 Hz, represents ¹³C-labeled lactate); NAA: N-acetyl-aspartate; Glx: glutamine plus glutamate; GABA: γ-aminobutyric acid; Glu: glutamate; Gln: glutamine; Asp: aspartate

Changes in the concentrations of lactate and alanine and of the TCA cycle related amino acids glutamine, glutamate, and GABA (Table 2), were calculated from $^1\text{H-NMR}$ spectra (Fig. 1). In rats subjected to HAL, the brain concentrations of lactate increased in relation to the severity of encephalopathy at precoma- and coma stages to 145% and 180% of sham-operated controls, respectively ($P < 0.01$).

Table 2: Concentrations of plasma and brain metabolites.

	Sham	Precoma	Coma
Brain ($\mu\text{mol/ g wet weight}$)			
Lactate	11.85 \pm 1.48	17.07 \pm 0.74 * \S	21.34 \pm 2.95 $\dagger\ddagger\parallel$
Alanine	3.68 \pm 0.39	4.95 \pm 1.19 * \ddagger	6.01 \pm 0.72 $\dagger\$\text{NS}$
Glutamine	5.20 \pm 0.46	23.45 \pm 2.19 * \parallel	22.55 \pm 1.19 $\dagger\parallel\text{NS}$
Glutamate	10.02 \pm 0.69	9.36 \pm 0.94 * NS	7.28 \pm 0.37 $\dagger\$\text{NS}$
GABA	2.46 \pm 0.29	2.29 \pm 0.33 * NS	2.42 \pm 0.18 $\dagger\text{NS}$
Plasma ($\mu\text{mol/ mL}$)			
Lactate	1.26 \pm 0.15	1.41 \pm 0.17 * NS	2.17 \pm 0.23 $\dagger\parallel$
Alanine	0.33 \pm 0.05	1.54 \pm 0.12 * \parallel	1.81 \pm 0.20 $\dagger\ddagger\parallel$
Glutamine	0.67 \pm 0.08	3.26 \pm 0.37 * \parallel	3.77 \pm 0.42 $\dagger\parallel\text{NS}$
Glutamate	0.18 \pm 0.02	0.48 \pm 0.06 * \parallel	0.41 \pm 0.06 $\dagger\parallel\text{NS}$
GABA	ND	ND	ND

The concentrations of the metabolites were calculated by integration of the respective signals in $^1\text{H-NMR}$ spectra of brain and blood plasma extracts obtained from sham-operated controls, and from rats with ALF at precoma- and coma stages. Values represent means \pm SD for $n = 4$.

Abbreviations: NS, not significant, ANOVA; ND, not detectable.

* significantly different from sham-operated controls.

\dagger significantly different at coma versus precoma stages ; \ddagger $p < 0.05$; \S $p < 0.01$; \parallel $p < 0.001$.

Alanine increased to 135% ($P < 0.05$) at precoma stages, and to 165% ($P < 0.01$) compared to sham-operated control values. In contrast to lactate, glutamine increased to a comparable extent in rats at both precoma and coma stages compared to sham-operated controls ($P < 0.001$). Glutamate decreased only at coma stages to 70% of control ($P < 0.01$), whereas brain GABA levels were unchanged in both groups. Increased concentrations of alanine, lactate, and glutamine, with the latter

showing no significant difference between the precoma and coma stage, were observed also in blood plasma of rats subjected to HAL.

Labeling of metabolites from [1-¹³C]glucose: theoretical considerations

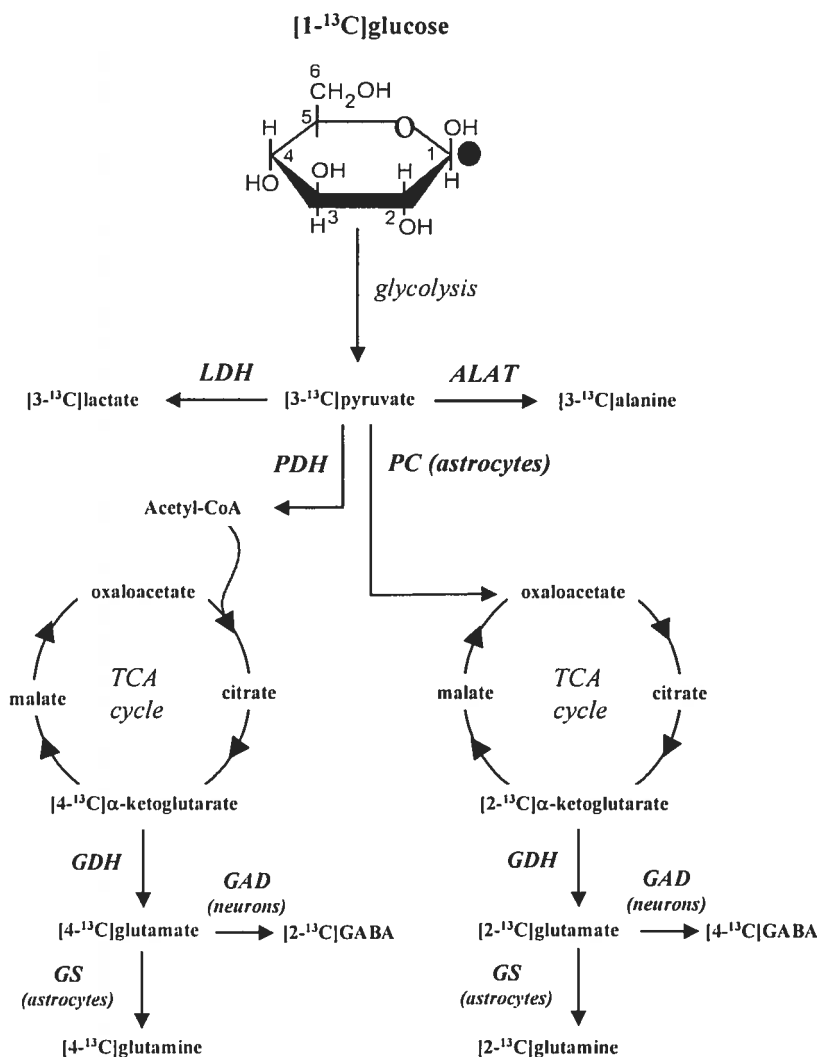


Figure 2: Metabolic fate of ¹³C-label from 1-¹³C-glucose.

Label distribution in lactate, alanine and TCA cycle intermediates from [1-¹³C]-glucose. Only one TCA cycle turn is considered. The label distribution after entry of ¹³C-labeled pyruvate via pyruvate carboxylase (PC) and pyruvate dehydrogenase (PDH) is presented; the label distribution arising via equilibration of oxaloacetate with fumarate is omitted for clarity. GABA: γ-aminobutyric acid.

The metabolic pathways whereby $[1-^{13}\text{C}]$ glucose is transformed into various metabolites are presented schematically in Figure 2.

After injection of $[1-^{13}\text{C}]$ glucose, glycolytic and TCA cycle intermediates are labeled in different carbon positions, depending on the metabolic pathway.

Via glycolysis, the ^{13}C -label in glucose becomes the C3-position in pyruvate. Subsequently, $[3-^{13}\text{C}]$ pyruvate is either transaminated to $[3-^{13}\text{C}]$ alanine, or reduced to $[3-^{13}\text{C}]$ lactate. Alternatively, $[3-^{13}\text{C}]$ pyruvate may enter the TCA cycle via the anaplerotic pathway (via pyruvate carboxylase, PC) or the oxidative pathway (via pyruvate dehydrogenase, PDH). In the anaplerotic pathway, C-3 of oxaloacetate is labeled followed by glutamate and glutamine (Glx) at C-2 (via equilibration of oxaloacetate with fumarate, Glx is also labeled at C3 (omitted for clarity)). In the oxidative pathway, pyruvate enters the cycle as $[2-^{13}\text{C}]$ acetyl-CoA via PDH. Glx is mono-labeled at C-4 during the first TCA turn and double-labeled after the second turn (omitted in figure 2). The order of labeled carbons is reversed in the case of GABA (i.e. the labels in $[2(4)-^{13}\text{C}]$ glutamate end up subsequently in $[4(2)-^{13}\text{C}]$ GABA). The isotopomers arising from the first turn of the cycle via PC or PDH are observed as singlet signals (i.e. monolabeled metabolites) in ^{13}C -NMR spectra.

$[1-^{13}\text{C}]$ glucose metabolism to lactate.

In ^1H -NMR spectra, unlabeled lactate can be distinguished from ^{13}C -labeled lactate showing an additional doublet splitting arising from ^1H - ^{13}C coupling (Fig. 1). From these resonances together with measurement of the pool size of lactate, ^{13}C -labeled lactate and its fractional ^{13}C -enrichment ($[3-^{13}\text{C}]/[^{12}\text{C}]$ lactate; indicating

relative *de novo* synthesis) were calculated and compared with changes in the total concentration of lactate ($[^{12}\text{C}] + [3\text{-}^{13}\text{C}]\text{lactate}$) (Fig. 3).

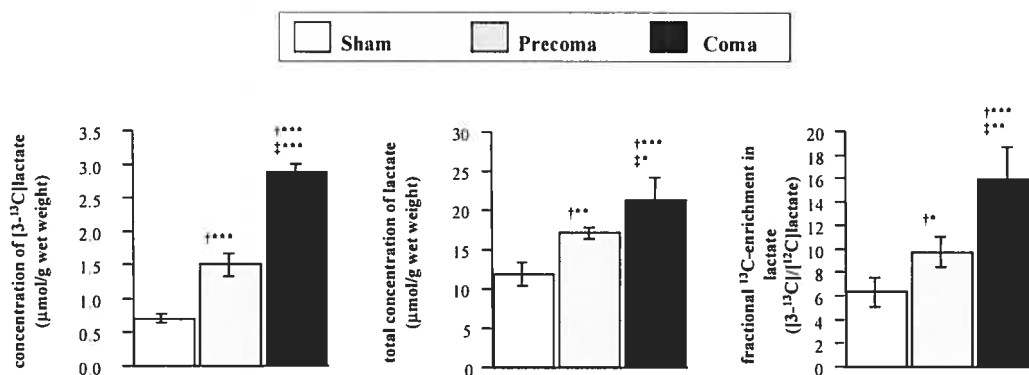


Figure 3: Concentrations and ^{13}C -enrichments of lactate.

Fractional ^{13}C -enrichments, and amounts of ^{13}C -labeled lactate and of $[^{13}\text{C}]+[^{12}\text{C}]\text{lactate}$ were obtained from ^1H - and ^{13}C -NMR spectra of brain extracts from sham-operated controls, and from rats with ALF at precoma- and coma stages 15 min after injection of $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{glucose}$. Values represent means \pm SD for $n = 4$ († significantly different from sham-operated controls; ‡ significantly different at coma versus precoma stages; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; ANOVA).

When ALF rats lost their righting reflex (precoma stage), ^{13}C -labeled lactate, synthesized from $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{glucose}$, increased more than two-fold. A further increase to $> 400\%$ of sham-operated control values was observed 12-14 hours after HAL (coma stage). The changes in *de novo* synthesis of lactate differed significantly between these groups ($P < 0.001$). Due to less changes in its total concentration, the fractional ^{13}C -enrichment in lactate was increased to 155% and 250% of control at precoma-

and coma stages ($P < 0.01$), respectively. The ^{13}C -enrichment ($[^{13}\text{C}]/[^{12}\text{C}]$) in blood plasma was very low ($< 0.5\%$) compared to brain tissue (6.5%), and no changes in $[3\text{-}^{13}\text{C}]\text{lactate}$ were observed after HAL in either precoma or coma groups of animals.

[1- ^{13}C]glucose metabolism to amino acids

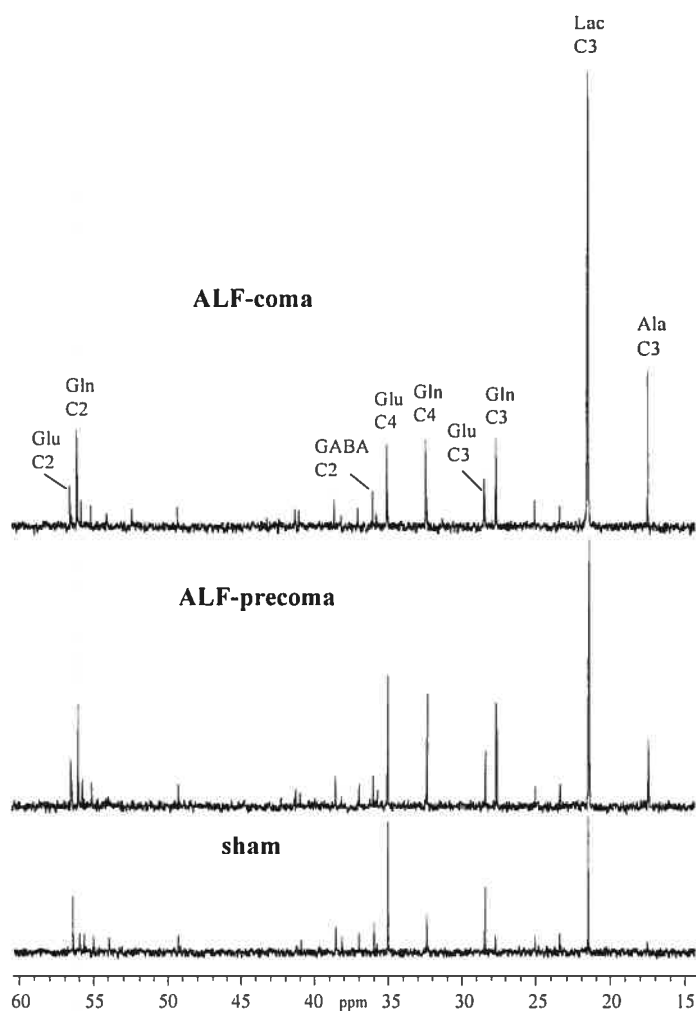


Figure 4: ^{13}C -NMR spectra of brain extracts.

^{13}C -NMR spectra of neutralized PCA extracts of brain obtained from a sham-operated control, and rats with ALF at precoma- and coma stages 15 min after injection of $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{glucose}$. Peak assignments: see legend to Fig. 1.

The relative ^{13}C -enrichments (%) and total amounts of newly synthesized metabolites other than lactate were calculated from ^{13}C -NMR spectra (Fig. 4 and 5).

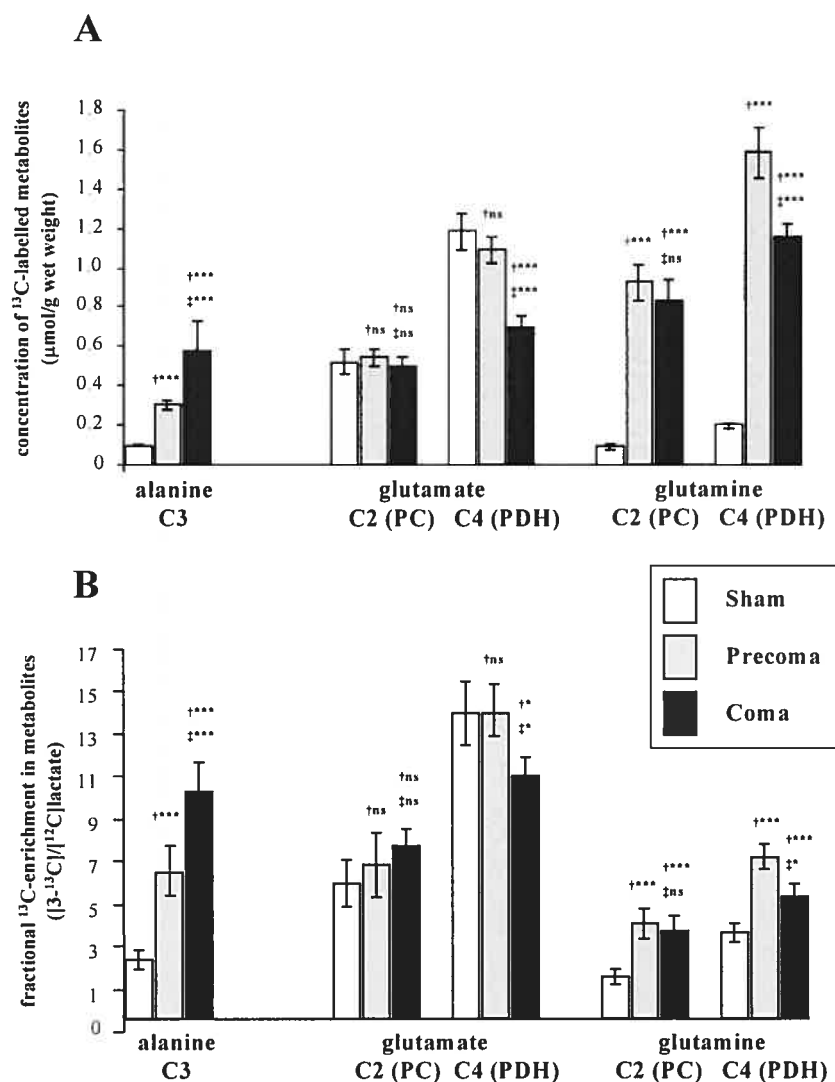


Figure 5: ^{13}C -label incorporation into alanine, glutamate and glutamine. Concentrations of ^{13}C ($\mu\text{mol/g}$ tissue) (A) and fractional ^{13}C -enrichments ($[^{13}\text{C}]/[^{12}\text{C}]$) (B) in individual carbon positions of alanine, glutamate and glutamine labeled 15 min after injection of $[1-^{13}\text{C}]$ glucose were calculated from ^{13}C -NMR spectra of brain extracts from sham-operated controls, and from rats with ALF at precoma- and coma stages. Values represent means \pm SD for $n = 4$ (\dagger significantly different from sham-operated controls; \ddagger significantly different at coma versus precoma stages; $*** p < 0.001$; $* p < 0.05$; ns, not significant; Student's t-test).

As observed for *de novo* synthesized lactate, ALF resulted in an increase of both the amount of [3-¹³C]alanine and its fractional ¹³C-enrichment to 320% and 250%, respectively, of control values at precoma stages and with further 6-fold and 4-fold increases at coma stages ($P < 0.001$).

Consistent with a substantial increase in the pool size of glutamine, the precoma- and coma stages of ALF were both associated with a significant increase of the total *de novo* synthesis of glutamine from [1-¹³C]glucose to >600% and >900% for the C-4 and C-2-positions, respectively ($P < 0.001$), as well as significant changes in the fractional ¹³C-enrichment in glutamine ($P < 0.001$).

At coma stages, a concomitant decrease of [4-¹³C]glutamate synthesis to 60% of sham-operated control values ($P < 0.001$) was observed, while no changes were detected for the C-2 position. No changes were observed for *de novo* synthesized GABA at either precoma- or coma stages of encephalopathy. Only minor amounts of ¹³C-labelled amino acids and no differences between the experimental groups were NMR detected in blood plasma 15 min after [1-¹³C]glucose injection.

Relative contribution of PC and PDH to glutamate and glutamine synthesis

Comparison of the ¹³C-label in different carbon positions in glutamine and glutamate provides information on the relative contribution of the anaplerotic compared to the oxidative pathway. An exact quantification of the relative contribution of the anaplerotic pathway is difficult, as the label in Glx at C-2 and C-3 may arise both via PC-mediated entry of pyruvate into the TCA cycle as well as during the second turn via PDH. As no double-labeled isotopomers were observed 15 min after [1-¹³C]glucose injection, the relative flux of label through PDH versus PC

was estimated as the $^{13}\text{C-4}/^{13}\text{C-2}$ ratio in Glx (Fig. 6). In sham-operated controls, the ratio of $^{13}\text{C-4}/^{13}\text{C-2}$ in glutamate is higher than in glutamine (3.42 ± 0.25 versus 2.14 ± 0.17), consistent with mainly neuronal glutamate (PDH) and astrocytic glutamine (PC) synthesis from glucose. The greater increase of $^{13}\text{C-2}$ in glutamine compared to $^{13}\text{C-4}$ at precoma- and coma stages indicates a relative activation of PC to 132% and 156%, respectively, compared to sham-operated controls.

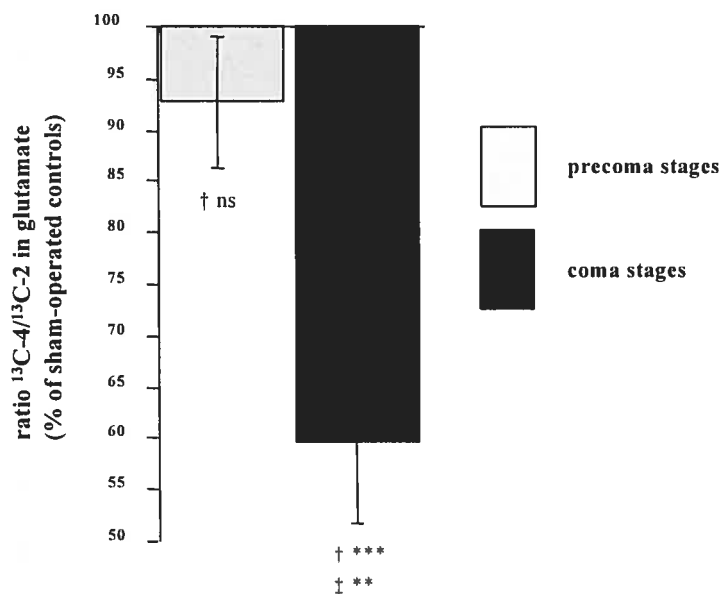


Figure 6: Relative contribution of flux through PDH versus PC.

The relative contribution of the oxidative (PDH) compared to the anaplerotic pathway (PC) to incorporation of ^{13}C -label from $[1-^{13}\text{C}]$ glucose into glutamate were calculated from ^{13}C -NMR spectra of brain extracts as ratio of $^{13}\text{C-4}/^{13}\text{C-2}$ in glutamate. Values are given as % of sham-operated controls and represent means \pm SD for $n = 4$ († significantly different from sham-operated controls; ‡ significantly different at coma versus precoma stages; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; ns, not significant; ANOVA).

On the other hand, the contribution of oxidative metabolism (via the PDH pathway) to glutamate synthesis decreased significantly at coma stages compared to precoma stages ($P < 0.01$).

Significance of changes in the synthesis rate of ^{13}C -labeled metabolites from [1- ^{13}C]glucose

In contrast to absolute concentrations, the fractional ^{13}C -enrichment in metabolites gives information on the relative significance of *de novo* synthesis during [1- ^{13}C]glucose metabolism. The increase of metabolite concentration was in the order glutamine > lactate > alanine. In contrast, although the fractional ^{13}C -enrichment in plasma [1- ^{13}C]glucose was comparable in all groups (Tab. 1), the increase of the fractional ^{13}C -enrichment in metabolites of glucose showed the reverse order, consistent with a relative stimulation of glycolytic compared to TCA cycle flux at coma stages of encephalopathy. To compare [^{13}C]metabolite synthesis with plasma [1- ^{13}C]glucose, the fractional ^{13}C -enrichments in metabolites were additionally divided by the fractional ^{13}C -enrichment in plasma [1- ^{13}C]glucose. The relative changes of this parameter in the experimental groups and their significance compared to sham-operated controls were in the same range as the values shown in Figure 3 and 5 (data not shown), which supports selective differences in glucose metabolism in ALF.

DISCUSSION

The hepatic devascularized rat is a well-validated experimental animal model of ALF which recapitulates the major features of ALF in humans (Swain et al.,

1992b) including severe encephalopathy, cytotoxic brain edema, sustained hyperammonemia and characteristic plasma and brain amino acid profiles (Mans et al., 1994; Swain et al., 1992b). Results of the present study using this animal model reveal significant alterations in brain metabolite concentrations and in their synthesis from ^{13}C -glucose. For example, *de novo* synthesis of ^{13}C -labeled glutamine from glucose is increased at both precoma and coma stages of encephalopathy compared to sham-operated controls. These findings confirm and extend those of previous biochemical and spectroscopic studies in cerebrospinal fluid and brain tissue from experimental animal models of ALF due to hepatectomy (Holmin et al., 1983), hepatic devascularization (Swain et al., 1992a; Mans et al., 1994; Michalak et al., 1996) or toxic liver injury (Peeling et al., 1993), in autopsied brain tissue from patients with ALF (Record et al., 1976), as well as in astrocytes after exposure to ammonia (Norenberg et al., 1994; Zwingmann et al., 1998).

Ammonia is detoxified in brain mainly by glutamine synthetase, an astrocytic enzyme. Increased brain glutamine has been demonstrated by *in vivo* ^1H -NMR spectroscopy in animal models (Bates et al., 1989; Bosman et al., 1990) and in patients with ALF (Gupta et al., 1993; McConnell et al., 1995). Results of the present study show that brain glutamine concentrations as well as its biosynthesis from glucose either via entry of pyruvate into the TCA cycle through pyruvate dehydrogenase (PDH), or via pyruvate carboxylase (PC), an astrocytic enzyme, is not further increased at coma (versus precoma) stages of encephalopathy. These findings suggest that there is a limit in the capacity for glutamine synthesis in brain in ALF. Previous studies also support this contention. For example, Cooper et al. in 1985 showed that the acutely hyperammonemic rat brain does not adapt to prolonged

hyperammonemia by increasing its glutamine synthetase activity (Cooper et al., 1987). More recently, in the same experimental model of ALF to the one used in the present study, glutamine synthetase mRNA and activity in brain were unchanged despite increased circulating ammonia concentrations (Desjardins et al., unpublished results). It had been previously suggested that increased synthesis of glutamine in astrocytes was a major cause of cell swelling leading to brain edema in this model of ALF (Cordoba et al., 1996; Blei, 2001). However, results of the present study showing no further significant increases of astrocytic glutamine synthesis at coma stages of encephalopathy (despite further increases of circulating ammonia and of brain water content) suggest that the osmotic effect of glutamine accumulation in the astrocytes may not be the major cause of cell swelling at least at late stages of ALF due to hepatic devascularization.

The astrocytic location of glutamine synthetase (Norenberg et al., 1979) determines the operation of an intercellular glutamine cycle, in which glutamine is released from astrocytes to the extracellular fluid to be taken up into neurons, where it is converted to neurotransmitter glutamate by the action of glutaminase. Following neuronal depolarization, glutamate is released from nerve terminals and subsequently taken up by astrocytes again where it is converted to glutamine. Results of the present $^1\text{H-NMR}$ study reveal that brain glutamate concentration is decreased in ALF rats, a finding which is consistent with previous biochemical studies in this animal model (Swain et al., 1992a; Mans et al., 1994). Moreover, isotopomer analysis of $^{13}\text{C-NMR}$ spectra shows that synthesis of $[4-^{13}\text{C}]$ -glutamate, which involves flux of carbon through PDH (pyruvate oxidation), is selectively decreased at coma stages, while synthesis of $[2-^{13}\text{C}]$ -glutamate (via PC in astrocytes) remains unchanged at both

precoma and coma stages of encephalopathy in ALF rats. These findings suggest that the decrease in brain glutamate in human and experimental ALF is the result of impaired oxidative metabolism in neurons resulting in decreased *de novo* synthesis of glutamate from glucose. Since neuronally-released glutamate is taken up by astrocytes as a substrate for glutamine synthetase (McKenna., 1996), reduced synthesis of neuronal glutamate could potentially limit ammonia removal (glutamine synthesis) by the astrocyte.

In contrast to glutamate and glutamine, no significant alterations in the *de novo* synthesis of brain GABA from glucose were apparent at any stage of ALF. These findings extend those of previous reports in which both whole brain (Swain et al., 1992a; Mans et al., 1994), cerebrospinal fluid (Swain et al., 1992b) and microdialysate (Michalak et al, 1996) concentrations of GABA were unchanged in this animal model of ALF. A lack of alterations of brain GABA has also been reported in hepatectomized rats (Holmin et al., 1983) as well as in cerebrospinal fluid (Moroni et al., 1987) or autopsied brain tissue (Record et al., 1976) from patients who died in ALF.

Direct measurements of high energy phosphates in brain in experimental ALF have failed to show loss of ATP (Holmin et al., 1983; Mans et al., 1994) and studies using ^1H - and ^{31}P -NMR have likewise yielded negative findings (Bates et al., 1989; Deutz et al., 1988; Fitzpatrick et al., 1989; Friolet et al., 1989). On the other hand, there is evidence to suggest that flux through the TCA cycle is decreased and glycolytic flux is concomitantly increased in brain in ALF. Consistent with this possibility, brain lactate concentrations have been consistently found to be increased in various animal models of ALF (Holmin et al., 1983; Mans et al., 1994; Peeling et

al., 1993; Bates et al., 1989; Deutz et al., 1988) as well as in brain extracellular fluid in the same animal model of ALF used in the present study (Michalak et al., 1996) and in human ALF brain (Tofteng et al., 2002). Furthermore, EEG changes in ALF rats are significantly correlated with the increased brain lactate concentrations (Deutz et al., 1988). Results of the present study add two new dimensions to this issue. Firstly, ALF results in increased *de novo* synthesis of lactate from glucose in brain, and, more importantly, the degree of increase in lactate synthesis correlates with severity of encephalopathy and brain edema in ALF. It is therefore conceivable that increases in brain lactate contribute to the pathogenesis of brain edema in ALF. In support of this possibility, elevated brain lactate was previously found to be associated with intracranial hypertension and poor neurological outcome during ALF in dogs (Nyberg et al., 1998) and exposure of cultured astrocytes to lactate results in significant cell swelling (Staub et al., 1990). Furthermore, mild hypothermia results in the prevention of brain edema and in normalization of cerebrospinal fluid lactate concentrations in rats with ALF (Chatauret et al., 2001). Brain edema and the resulting increased intracranial pressure constitute a major cause of death in patients with ALF (Cordoba et al., 1995; Larsen et al., 2001). The cause of the decreased TCA cycle flux and subsequently increased lactate production in brain in ALF is unknown. However, brain ammonia increases to millimolar levels in experimental ALF (Swain et al., 1992a; Mans et al., 1994), and comparable concentrations of ammonia cause inhibition of α -ketoglutarate dehydrogenase (Lai et al., 1986), a rate-limiting TCA cycle enzyme. Ammonia has also been shown to stimulate the glycolytic enzyme phosphofructokinase (Lowry et al., 1966).

In summary, the combination of ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopy has been used in the present study to measure brain glucose metabolism and amino acid synthesis as a function of the severity of encephalopathy and brain edema in rats with ALF due to hepatic devascularization. ^1H -NMR studies revealed increased brain concentrations of glutamine, lactate and alanine confirming and extending the results of previous biochemical studies. [^1H - ^{13}C]-NMR isotopomer analysis showed a selective increase of *de novo* synthesis of lactate, alanine and glutamine from [$1\text{-}^{13}\text{C}$]glucose, and adds additional insights into metabolic alterations in ALF. While synthesis of lactate and alanine was correlated with severity of encephalopathy and brain edema; increased glutamine synthesis showed no such correlations, consistent with a relative stimulation of glycolytic compared to TCA cycle flux at coma stages of encephalopathy. In addition, the NMR study using [$1\text{-}^{13}\text{C}$]glucose reveals that the selective decrease in brain glutamate at coma stages was principally the result of decreased flux of glucose through pyruvate dehydrogenase mainly in the neuronal compartment. These findings obtained by [^1H - ^{13}C]NMR suggest that alterations of cellular glucose- and energy metabolism rather than the intracellular (astrocytic) accumulation of glutamine are the major cause of encephalopathy and brain edema in this model of ALF. Future real-time studies of metabolic rates using NMR spectroscopy and stable isotopes (particularly ^{13}C) may be potentially useful in the study of the dynamics of brain metabolism in patients with ALF.

ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by a grant from The Canadian Institutes of Health Research. Dr. Zwingmann is a recipient of research awards from the Quebec Ministry of Education and Deutsche Forschungsgemeinschaft, Germany.

REFERENCES

- Bachelard H, Badar-Goffer R. (1993). NMR spectroscopy in neurochemistry. *J Neurochem* **61**:412-429.
- Badar-Goffer R, Bachelard H. (1991). Metabolic studies using ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Essays Biochem* **26**:105-119.
- Bates TE, Williams SR, Kauppinen RA, Gadian DG. (1989). Observation of cerebral metabolites in an animal model of acute liver failure *in vivo*: a ^1H and ^{31}P nuclear magnetic resonance study. *J Neurochem* **53**:102-110.
- Blei AT. (2001). Pathophysiology of brain edema in fulminant hepatic failure, revisited. *Metab Brain Dis* **16**:85-94.
- Bosman DK, Deutz NE, De Graaf AA, vd Hulst RW, Van Eijk HM, Bovee WM, Maas MA et al. (1990). Changes in brain metabolism during hyperammonemia and acute liver failure: results of a comparative ^1H -NMR spectroscopy and biochemical investigation. *Hepatology* **12**:281-290.
- Brand A, Gil S, Leibfritz D, Yavin E. (1998). Direct administration and utilization of [1- ^{13}C]glucose by fetal brain and liver tissues under normal and ischemic conditions: ^1H , ^{31}P , and ^{13}C NMR studies. *J Neurosci Res* **54**:97-108.

Cerdan S, Kunnecke B, Seelig J. (1990). Cerebral metabolism of [1,2-¹³C₂]acetate as detected by *in vivo* and *in vitro* ¹³C NMR. *J Biol Chem* **265**:12916-12926.

Chatauret N, Rose C, Therrien G, Butterworth RF. (2001). Mild hypothermia prevents cerebral edema and CSF lactate accumulation in acute liver failure. *Metab Brain Dis* **16**:95-102.

Cooper AJ, Lai JC. (1987). Cerebral ammonia metabolism in normal and hyperammonemic rats. *Neurochem Pathol* **6**:67-95.

Cooper AJ, Mora SN, Cruz NF, Gelbard AS. (1985). Cerebral ammonia metabolism in hyperammonemic rats. *J Neurochem* **44**:1716-1723.

Cordoba J and Blei AT. (1996). Brain edema and hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* **16**:271-280.

Cordoba J, Blei AT (1995). Cerebral edema and intracranial pressure monitoring. *Liver Transpl Surg*. **1**:187-194.

Deutz NEP, De Graaf AA, De Haan JG, Bovée WMMJ and Chamuleau RAFM (1988): *In vivo* brain ¹H-NMR spectroscopy (¹H-NMRS) during acute hepatic encephalopathy (HE). In: Soeters PB, Wilson JHP, Meijer AJ and Holm E, eds. *Advances in Ammonia Metabolism and Hepatic Encephalopathy*. Chap. 57. Amsterdam : Excerpta Media, 439-446.

Dienst SG. (1961). An ion exchange method for plasma ammonia concentration. *J Lab Clin Med* **1**;58:149-155.

Fitzpatrick SM, Hetherington HP, Behar KL, Shulman RG. (1989). Effects of acute hyperammonemia on cerebral amino acid metabolism and pHi *in vivo*, measured by ¹H and ³¹P nuclear magnetic resonance. *J Neurochem* **52**:741-749.

Friolet R, Colombo JP, Lazeyras F, Aue WP, Kretschmer R, Zimmermann A, Bachmann C. (1989). *In vivo* ^{31}P NMR spectroscopy of energy rich phosphates in the brain of the hyperammonemic rat. *Biochem Biophys Res Commun* **159**:815-820.

Gruetter R, Novotny EJ, Boulware SD, Mason GF, Rothman DL, Shulman GI, Prichard JW, Shulman RG. (1994). Localized ^{13}C NMR spectroscopy in the human brain of amino acid labeling from D-[1- ^{13}C]glucose. *J Neurochem* **63**:1377-1385.

Gruetter R, Novotny EJ, Boulware SD, Rothman DL, Mason GF, Shulman GI, Shulman RG, Tamborlane WV. (1992). Direct measurement of brain glucose concentrations in humans by ^{13}C NMR spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:1109-1112.

Gupta RK, Saraswat VA, Poptani H, Dhiman RK, Kohli A, Gujral RB, Naik SR. (1993). Magnetic resonance imaging and localized *in vivo* proton spectroscopy in patients with fulminant hepatic failure. *Am J Gastroenterol* **88**:670-674.

Holmin T, Agardh CD, Alinder G, Herlin P, Hultberg B. (1983). The influence of total hepatectomy on cerebral energy state, ammonia-related amino acids of the brain and plasma amino acids in the rat. *Eur J Clin Invest* **13**:215-220.

Lai JC, Cooper AJ. (1986). Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *J Neurochem* **47**:1376-1386.

Larsen FS, Gottstein J, Blei AT. (2001). Cerebral hyperemia and nitric oxide synthase in rats with ammonia induced brain edema. *J Hepatol* **34**:548-554.

Lee SH, Fischer, B. (1961). Portacaval shunt in the rat. *Surgery* **50**:668-672.

Lowry OH, Passonneau JV. (1966). Kinetic evidence for multiple binding sites on phosphofructokinase. *J Biol Chem* **241**:2268-2279.

Mans AM, DeJoseph MR, Hawkins RA. (1994). Metabolic abnormalities and grade of encephalopathy in acute hepatic failure. *J Neurochem* **63**:1829-1938.

Marmarou A, Poll W, Shulman K, Bhagavan H. (1978). A simple gravimetric technique for measurement of cerebral edema. *J Neurosurg* **49**:530-537.

McConnell JR, Antonson DL, Ong CS, Chu WK, Fox IJ, Heffron TG, Langnas AN and Shaw BW Jr. (1995). Proton spectroscopy of brain glutamine in acute liver failure. *Hepatology* **22**:69-74.

McKenna MC, Sonnewald U, Huang X, Stevenson J, Zielke HR. (1996) Exogenous glutamate concentration regulate the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J Neurochem* **66**:386-393.

Michalak A, Rose C, Butterworth J, Butterworth RF. (1996). Neuroactive amino acids and glutamate (NMDA) receptors in frontal cortex of rats with experimental acute liver failure. *Hepatology* **24**:908-913.

Moroni F, Riggio O, Carla V, Festuccia V, Ghinelli F, Marino IR, Merli M, et al. (1987). Hepatic encephalopathy: lack of changes of gamma-aminobutyric acid content in plasma and cerebrospinal fluid. *Hepatology* **7**:816-820.

Norenberg MD, Bender AS. (1994). Astrocyte swelling in liver failure: role of glutamine and benzodiazepines. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* **60**:24-27.

Norenberg MD, Martinez-Hernandez A. (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* **161**:303-310.

Nyberg SL, Cerra FB, Gruetter R. (1998). Brain lactate by magnetic resonance spectroscopy during fulminant hepatic failure in the dog. *Liver Transpl Surg.* **4**:158-165.

Peeling J, Shoemaker L, Gauthier T, Benarroch A, Sutherland GR, Minuk GY. (1993). Cerebral metabolic and histological effects of thioacetamide-induced liver failure. *Am J Physiol* **265**:G572-578.

Pfeuffer J, Tkac I, Choi IY, Merkle H, Ugurbil K, Garwood M, Gruetter R. (1999). Localized *in vivo* ^1H NMR detection of neurotransmitter labeling in rat brain during infusion of $[1-^{13}\text{C}]$ D-glucose. *Magn Reson Med* **41**:1077-1083.

Record CO, Buxton B, Chase RA, Curzon G, Murray-Lyon IM, Williams R. (1976). Plasma and brain amino acids in fulminant hepatic failure and their relationship to hepatic encephalopathy. *Eur J Clin Invest* **6**:387-394.

Sibson NR, Dhankhar A, Mason GF, Behar KL, Rothman DL, Shulman RG. (1997). *In vivo* ^{13}C NMR measurements of cerebral glutamine synthesis as evidence for glutamate-glutamine cycling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:2699-2704.

Staub F, Baethmann A, Peters J, Weigt H, Kempfski O. (1990). Effects of lactacidosis on glial cell volume and viability. *J Cereb Blood Flow Metab* **10**:866-876.

Swain M, Butterworth RF, Blei AT. (1992a). Ammonia and related amino acids in the pathogenesis of brain edema in acute ischemic liver failure in rats. *Hepatology* **15**:449-453.

Swain MS, Bergeron M, Audet R, Blei AT, Butterworth RF. (1992b). Monitoring of neurotransmitter amino acids by means of an indwelling cisterna magna catheter: a comparison of two rodent models of fulminant liver failure. *Hepatology* **16**:1028-1035.

Tofteng F, Larsen FS. (2002). Monitoring extracellular concentrations of lactate, glutamate, and glycerol by in vivo microdialysis in the brain during liver transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl* **8**:302-305.

Zwingmann C, Brand A, Richter-Landsberg C, Leibfritz D. (1998). Multinuclear NMR spectroscopy studies on NH₄Cl-induced metabolic alterations and detoxification processes in primary astrocytes and glioma cells. *Dev Neurosci* **20**:417-426.

3. ARTICLE 3:**EFFECTS OF MILD HYPOTHERMIA ON BRAIN GLUCOSE METABOLISM IN ACUTE LIVER FAILURE: $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE STUDY.**

Gastroenterology. 125, 2003

Nicolas Chatauret¹, Claudia Zwingmann^{1,2}, Christopher Rose¹, Dieter Leibfritz², Roger F. Butterworth¹

¹Neuroscience Research Unit, CHUM (Hôpital Saint-Luc), Montréal, Québec, Canada H2X 3J4.

²Department of Organic Chemistry, University of Bremen, Bremen, Germany.

ABSTRACT

Background & Aims: Mild hypothermia has a protective effect on brain edema and encephalopathy in both experimental and human acute liver failure. The goals of the present study were to examine the effects of mild hypothermia (35°C) on brain metabolic pathways using combined ^1H and ^{13}C -Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, a technique which allows the study not only of metabolite concentrations but also their *de novo* synthesis via cell-specific pathways in the brain.

Methods: ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy using $[1-^{13}\text{C}]$ glucose was performed on extracts from frontal cortex obtained from groups of rats with acute liver failure induced by hepatic devascularization whose body temperature was maintained either at 37°C (normothermic) or 35°C (hypothermic), and appropriate sham-operated controls. Results: At coma stages of encephalopathy in the normothermic acute liver failure animals, glutamine concentrations in frontal cortex increased 3.5-fold compared to the sham-operated controls ($p < 0.001$). Comparable increases in glutamine were observed in hypothermic animals despite the absence of severe encephalopathy (coma). Concomitant to decreased glucose oxidative metabolism in normothermic groups of acute liver failure, glutamate and aspartate concentrations were respectively decreased to $60.9\% \pm 7.7\%$ and $42.2\% \pm 5.9\%$ ($p < 0.01$; $p < 0.001$) compared to control and were restored to normal values by mild hypothermia. Concentrations of lactate and alanine in frontal cortex were respectively increased to $169.2\% \pm 15.6\%$ ($p < 0.001$) and $267.3\% \pm 34.0\%$ in normothermic rats compared to controls. Noticeable, *de novo* synthesis of lactate and alanine increased to $446.5\% \pm 48.7\%$ ($p < 0.001$) and $707.9\% \pm 65.7\%$ ($p < 0.001$), respectively, resulting in increased fractional ^{13}C -enrichments in these cytosolic metabolites. Again, these selective

changes of glycolytic glucose metabolism were prevented by mild hypothermia.

Conclusions: Mild hypothermia (35°C) prevents the encephalopathy and brain edema resulting from hepatic devascularization, selectively normalizes lactate and alanine synthesis from glucose, and prevents the impairment of oxidative metabolism associated with this model of ALF, but has no significant effect on brain glutamine. These findings suggest that a deficit in brain glucose metabolism rather than glutamine accumulation is the major cause of the cerebral manifestations of acute liver failure.

INTRODUCTION

The principal cause of mortality in patients with acute liver failure (ALF) is brain herniation resulting from intracranial hypertension caused by a progressive increase of brain water content (Blei., 1991). The pathophysiologic mechanisms responsible for brain edema in ALF have not been fully elucidated; however, ammonia remains the prime candidate. Hyperammonemia is invariably observed in ALF and a recent study revealed a significant correlation between arterial ammonia concentrations and the complication of brain herniation in patients with ALF (Clemmensen et al., 1999). Ammonia-related mechanisms which have been proposed to explain the encephalopathy and brain edema in ALF include direct electrophysiologic actions of the ammonium ion on excitatory/inhibitory neurotransmission (Szerb., 1992), osmotic effects resulting from the cerebral accumulation of the ammonia detoxification product, glutamine (Cordoba et al., 1996) as well as effects of ammonia on cerebral energy metabolism (Rao et al., 2001), astrocytic glutamate transport (Knecht et al., 1997) and glutamate (NMDA) receptors (Kosenko et al., 1994; Michalak et al., 1996).

Mild hypothermia prevents brain edema in both experimental (Traber et al., 1989; Rose et al., 2000; Chatauret et al., 2001) and human (Jalan et al., 1999) ALF. Not only do these findings herald the possibility of new approaches to the management of patients with ALF, they also provide an important research tool with which to investigate basic mechanisms responsible for brain edema and encephalopathy in ALF. The goals of the present study, therefore, were to study the effects of mild hypothermia (35°C) on brain metabolic pathways, i.e. glucose metabolism, using combined ^1H and ^{13}C -Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

spectroscopy, a technique which facilitates the study not only of metabolites but also their *de novo* synthesis and cell-specific pathways (Zwingmann et al., 2003) in the brain.

Materials and Methods

Experimental animal model of acute liver failure (ALF)/surgical procedures.

ALF was induced in adult male Sprague-Dawley rats (175-200 g) by portacaval anastomosis (PCA) according to the guidelines of Lee and Fischer (Lee et al., 1961) followed by hepatic artery ligation (HAL). In brief, the rats were anesthetized with halothane, the inferior vena cava and portal vein were isolated, the inferior vena cava was partially clamped (anastomosis clamp, Roboz Instruments Inc, Washington, D.C.), and an elliptical piece of vein 1.5 times the portal vein diameter was removed. The portal vein was ligated and cut, and an end-to-side anastomosis was performed under a dissecting microscope. Total surgery time was < 15 min. Sham-operated control rats, matched for weight, were similarly anesthetized, a laparotomy was performed, and the inferior vena cava and portal vein were occluded for 15 min. Following surgery, all animals were housed individually under constant conditions of temperature, humidity, and light cycles and were allowed free access to standard laboratory chow and water. Overall mortality for shunted rats was less than 5%. Fourty eight hours after PCA surgery, animals were anesthetized with halothane and subjected to hepatic artery ligation (HAL) or laparotomy (controls). Following HAL, body temperatures were monitored continuously and maintained at either 35 °C (hypothermic) or 37 °C (normothermic) by means of thermal pads and heating lamps. Animals were assessed neurologically every 30 min during progression of ALF.

Animals that could no longer right themselves after being placed on their backs were considered to be in precoma stage; animals in which both righting ability and corneal reflex could not be elicited were considered to be in coma. Hypothermic rats were killed at the same time post-HAL as the comatose normothermic rats. All animals received humane care according to the criteria outlined in the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health (NIH publication 6-23 (revised), 1985).

Control of arterial glucose concentrations and administration of [1-¹³C]glucose.

Arterial blood glucose levels were monitored every hour and glucose was administered subcutaneously as needed to maintain normoglycemia. To ensure the same fractional ¹³C-enrichment in glucose entering the brain, blood glucose levels were adjusted to equal levels in all experimental groups immediately before administration of [1-¹³C]glucose (6.62 ± 0.49, 6.48 ± 0.52 and 6.80 ± 0.61 mM in normothermic controls, in normothermic ALF rats and hypothermic ALF groups, respectively). After administration of [1-¹³C]glucose, the fractional enrichments in blood glucose ([1-¹³C]/[¹²C]glucose), determined from ¹H-NMR spectra were not significantly different between the experimental groups (24.55 ± 2.05, 25.09 ± 1.81 and 22.92 ± 1.97 in sham operated controls, in normothermic and hypothermic ALF groups, respectively).

Preparation of brain extracts

Sham-operated control rats and hepatic devascularized rats maintained at 37°C at coma stages (normothermic ALF rats) or at 35°C (hypothermic ALF rats) at

comparable post-surgery time points were administered [$1-^{13}\text{C}$]glucose (200 mg/kg, IP.; Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA) and killed 15 min later by decapitation. The bolus injection of glucose in unanaesthetized rats was chosen to facilitate the study of metabolic changes in relation to neurological status and to avoid hyperglycemic conditions. The blood was taken from the neck wound and immediately mixed with 20% perchloric acid (PA). Forebrains were immediately frozen in isopentane (at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), dissected over dry ice for the frontal cortex and frozen in liquid nitrogen. The samples were powdered over liquid nitrogen. Blood and tissue samples were extracted with 12% perchloric acid as previously described (Zwingmann et al., 2003).

Brain water

Water content of the brain (percentage) was measured gravimetrically using a density gradient of bromobenzene-kerosene precalibrated with K_2SO_4 as previously described (Marmarou et al., 1978). Eight measurements were made per animal, and values were arithmetically averaged.

Ammonia Measurement

Plasma ammonia and cerebrospinal fluid ammonia concentrations were estimated using a commercial ammonia test kit, which uses an ion-exchange method, followed by colorimetric measurement of ammonia nitrogen with the Bertholet phenate-hypochlorate reaction ($n=8$ in each experimental group) (Dienst., 1961).

NMR spectroscopy

The lyophilized PA extracts of brain tissue and blood plasma were dissolved in 0.6 ml deuterium oxide (D_2O) and centrifuged. Prior to NMR analysis, the pH was adjusted to 7.0 with deuterium chloride (DCl) and NaOD. 1H - and ^{13}C -NMR spectra were recorded on Bruker DRX 600 or AVANCE NB360/WB 360 spectrometers, operating at frequencies of 600 MHz or 360 MHz for 1H -, and 150.9 MHz or 90.5 MHz for ^{13}C -measurements. 1H -NMR spectra were recorded with a 5-mm H,C,N inverse triple resonance probe, 400 accumulations, repetition time 15 s, spectral width 7183 Hz (DRX 600) or 3623 Hz (AM/AMX 360). Chemical shifts were referenced to lactate at 1.33 ppm. ^{13}C -NMR spectra were recorded with a 5-mm $^1H/^{13}C$ dual probe, 10,000 accumulations, repetition time 2.5 s, composite pulse decoupling with WALTZ-16, spectral width 47,619 Hz (DRX 600) or 20,833 Hz (AM/AMX 360). Chemical shifts were referenced to the C-3 signal of lactate at 21.3 ppm.

Measurement of metabolite concentrations

Lactate concentrations were determined enzymatically (adapted for measurement in 96-well microtiter ELISA plates) using a commercially available kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). The concentrations ($\mu\text{mol/g}$ tissue) of other unlabeled metabolites and their pool sizes ($[^{13}C] + [^{12}C]$) were determined from fully relaxed 1H -NMR spectra of blood and brain extracts, obtained after injection of $[1-^{13}C]$ glucose or equivalent amounts of unlabeled glucose, using the known lactate concentrations as an internal standard.

Calculation of fractional ^{13}C -enrichments

The fractional ^{13}C -enrichment in lactate was calculated as the ratio of [3- ^{13}C]lactate to the concentration of unlabeled lactate by integration of the respective peak areas of the methyl groups in ^1H -NMR spectra (Fig. 1):

$$\text{fractional } ^{13}\text{C}\text{-enrichment} = \frac{\text{area } (^1\text{H-}^{13}\text{C})}{\text{area } (^1\text{H-}^{12}\text{C})} \times 100 \quad (1)$$

The values were corrected for 1.1 % natural abundance ^{13}C in unlabeled lactate. ^{13}C in [1- ^{13}C]glucose was calculated in the same way using the H1 α glucose resonances in ^1H -NMR spectra. The fractional ^{13}C -enrichment of each carbon of other metabolites was derived from peak area ratio of the ^{13}C -labeled carbon/natural abundance carbon and using the known ^{13}C -enrichment in lactate as internal standard as described in detail previously (Zwingmann et al., 2003; Zwingmann et al., 2000). The absolute amount of ^{13}C in a specified carbon position (absolute synthesis from [1- ^{13}C]glucose; $\mu\text{mol/g}$ wet weight) is the concentration of the unlabeled metabolite times the fractional ^{13}C -enrichment.

Theoretical labeling of metabolites from [1- ^{13}C]glucose.

The metabolic pathways whereby the ^{13}C -label from [1- ^{13}C]glucose is transformed into various metabolites are presented schematically in Figure 1 (Zwingmann et al., 2000). Briefly, via the glycolytic pathway, [1- ^{13}C]glucose is transformed to [3- ^{13}C]pyruvate, [3- ^{13}C]alanine and [3- ^{13}C]lactate. [3- ^{13}C]pyruvate may enter the TCA cycle via the anaplerotic pathway (pyruvate carboxylase, PC (or

malic enzyme (ME)) or via the oxidative pathway (pyruvate dehydrogenase, PDH). Via PC, glutamate and glutamine are labeled at C-2. In the oxidative pathway, pyruvate enters the cycle as [2-¹³C]acetyl-CoA, and glutamate and glutamine are mono-labeled at C-4. The ratio of C4/C2 in glutamate and glutamine was used to estimate the relative contribution of the PDH versus the PC pathway. The order of labeled carbons is reversed in γ -aminobutyric acid (GABA) (i.e. the labels in [2(4)-¹³C]glutamate end up in [4(2)-¹³C]GABA) (not shown in Figure 1). Because we did not observe double-labeled isotopomers, only 1 TCA cycle turn is shown in Figure 1. Isotopomers arising from scrambling of the label within the TCA are omitted for clarity.

Statistical analysis

The NMR studies were carried out with sham-operated controls (n = 6) and 12 hepatic devascularized rats (n=6 normothermic ALF rats and n=6 hypothermic ALF rats). Data are expressed as mean \pm SD. Data between individual groups were analyzed using ANOVA and post-hoc Tukey's test. Differences were considered significant when $p < 0.05$ († significantly different from sham-operated controls; ‡ significantly different between hypothermic and normothermic groups; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

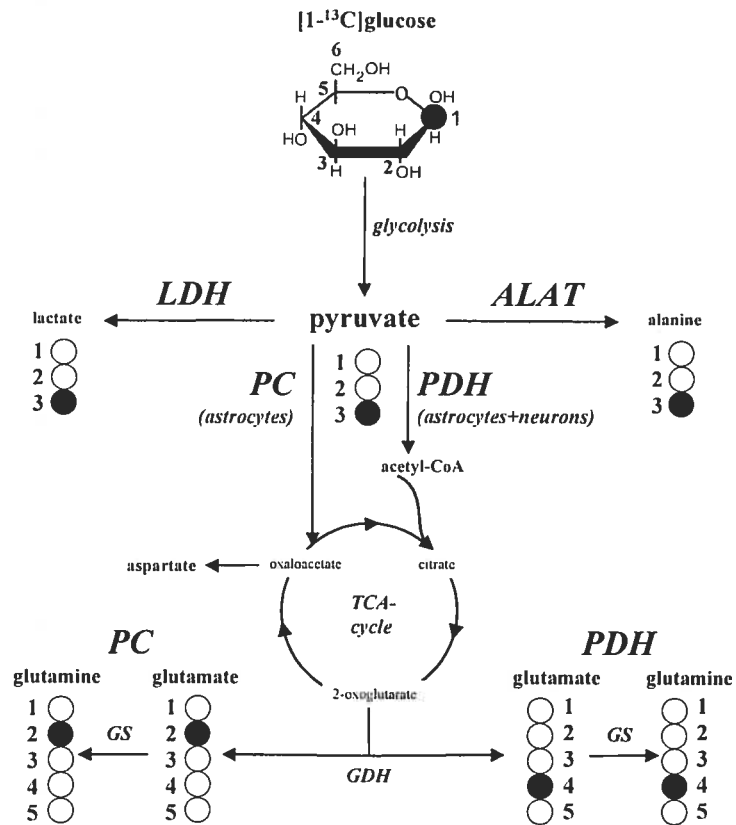


Figure 1: Labeling of metabolites from $[1-^{13}\text{C}]$ glucose: label distribution in glycolytic and TCA cycle intermediates during metabolism of $[1-^{13}\text{C}]$ glucose.

A single turn of the TCA cycle from pyruvate via PC (pyruvate carboxylase) or PDH (pyruvate dehydrogenase) to 2-oxoglutarate and subsequently glutamate and glutamine is considered. A description of the pathways leading to the different isotopomers is provided in the text. LDH: lactate dehydrogenase; ALAT: alanine aminotransferase; GAD: glutamate decarboxylase; GDH: glutamate dehydrogenase; GS: glutamine synthetase.

RESULTS

Following hepatic devascularization in normothermic ALF rats ($n=8$) developed progressive encephalopathy consisting of loss of activity, loss of righting ability (precoma stage), and loss of corneal reflex (coma stage at 13.4 ± 1.1 hours). At times

when the normothermic ALF rats were comatose, none of the hypothermic ALF rats (n=8) had developed significant neurological symptoms. Hypothermic ALF rats eventually became comatose at 18.3 ± 1.1 h post-HAL, confirming a previous report (Traber et al, 1989). Plasma ammonia levels were not significantly different between the 2 groups at any time point studied (Table 1) whereas CSF ammonia concentrations were significantly less (by 34%, $p < 0.01$, n=8) in the hypothermic than in the normothermic ALF group at coma stages of encephalopathy ($672 \pm 73 \mu\text{g/dL}$ vs $1007 \pm 78 \mu\text{g/dL}$) (Table 1). Normothermic ALF rats manifested increased brain water content, whereas mild hypothermia led to a significant attenuation of this increase (sham, $80.22 \pm 0.12\%$; normothermic ALF rats, $81.74 \pm 0.13\%$; hypothermic ALF rats, $80.48 \pm 0.15\%$; $p < 0.01$ compared with the normothermic ALF group, n=8 in each group) (Table 1).

Table 1: Plasma and CSF ammonia and brain water content in ALF rats.

	Sham	Normothermic ALF rats	Hypothermic ALF rats
Plasma ammonia ($\mu\text{g/dL}$)	64.7 ± 9.5	$640 \pm 33.8^{a,b}$	$585.7 \pm 34.2^{a,b}$
CSF ammonia ($\mu\text{g/dL}$)	52.4 ± 9.5	$1007 \pm 77.8^{a,b}$	$671 \pm 72.8^{a-d}$
Brain water content (%)	80.22 ± 0.12	$81.74 \pm 0.13^{a,b}$	$80.48 \pm 0.15^{a-d}$

NOTE. Plasma and CSF ammonia, as well as brain water content, were determined as described in the text in sham-operated control rats (n=8), and rats with ALF were maintained at 37°C (ALF-coma) (n=8) or 35°C (ALF hypothermia) (n=8). Values represent means \pm SD (^asignificantly different from sham-operated controls; ^csignificant differences between hypothermic and normothermic groups; ^b $p < 0.001$; ^d $p < 0.05$; ns, not significant; by ANOVA).

Brain amino acid concentrations

The concentrations of amino acids related to the TCA cycle and neurotransmitter metabolism, i.e. glutamine, glutamate, γ -aminobutyric acid (GABA),

aspartate as well as the neuronal marker molecule N-acetyl-aspartate (NAA) were calculated from $^1\text{H-NMR}$ spectra (Figures 2 and 3). At coma stages (10-12h after HAL) brain glutamine concentrations were significantly increased both in the normothermic and the hypothermic rats compared with controls (to $374\% \pm 31.0\%$ $p < 0.001$) and $387\% \pm 49.0\%$, $p < 0.001$ respectively; $n=6$).

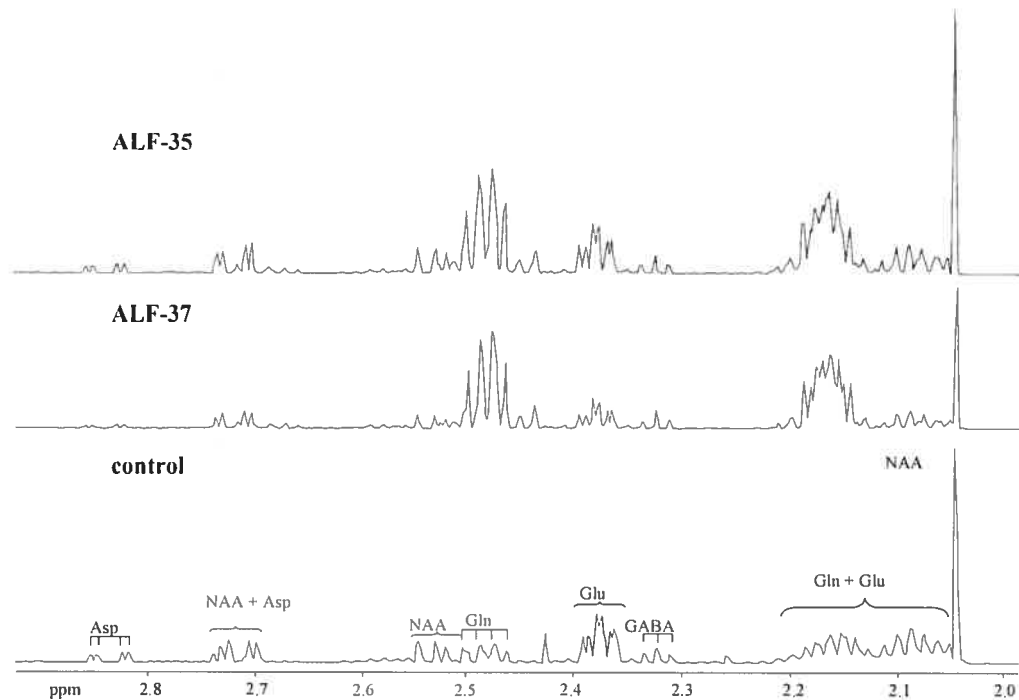


Figure 2: $^1\text{H-NMR}$ spectra of brain extracts in ALF: effect of hypothermia. Figure shows typical segments of $^1\text{H-NMR}$ spectra extracts obtained from frontal cortex of a sham-operated control rat compared with rats with ALF maintained at either $37\text{ }^\circ\text{C}$ (ALF-37) or $35\text{ }^\circ\text{C}$ (ALF-35). Peak assignments: GABA: γ -aminobutyric acid; Glu: glutamate; Gln: glutamine; NAA: N-acetyl-aspartate; Asp: aspartate.

Glutamate, aspartate and NAA concentrations in frontal cortex were decreased in normothermic rats to $60.9\% \pm 7.7\%$ ($p < 0.01$), $42.2\% \pm 5.9\%$ ($p < 0.001$) and $70.7\% \pm 7.0\%$ ($p < 0.01$), respectively, but normalized to control values under

hypothermic conditions. GABA levels were unchanged in both normothermic and hypothermic rats.

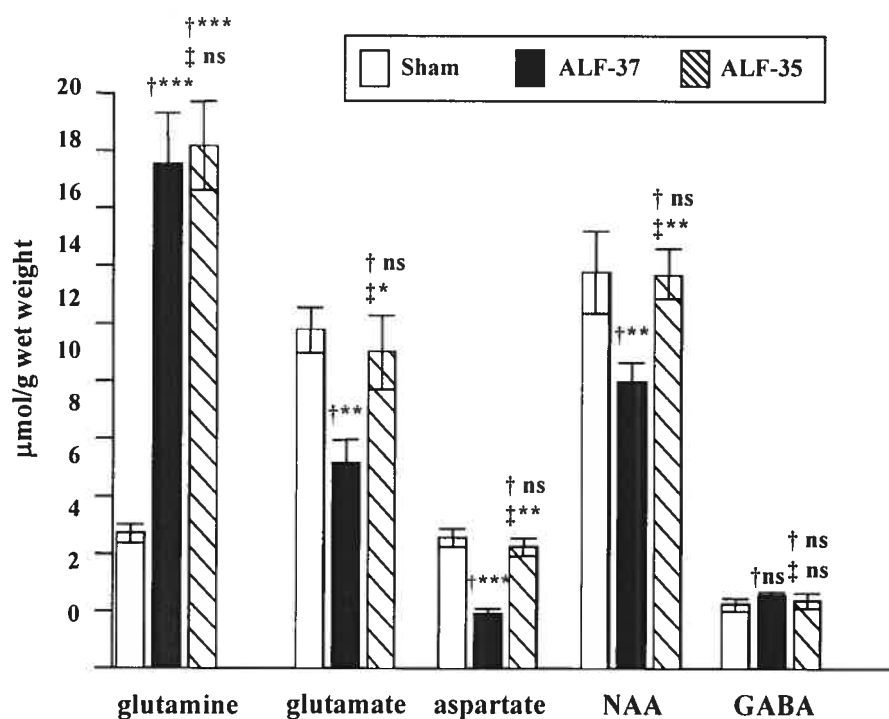


Figure 3: Concentrations of brain amino acids in ALF: effect of hypothermia. Figure shows concentrations of amino acids, calculated from $^1\text{H-NMR}$ spectra of extracts obtained from frontal cortex of sham-operated control rats ($n=6$) and of rats with ALF maintained at $37\text{ }^\circ\text{C}$ at coma stage ($n=6$) and rats with ALF maintained at $35\text{ }^\circ\text{C}$ ($n=6$). Values represent means \pm SD for $n = 6$ (\dagger significantly different from sham-operated controls; \ddagger significantly different between hypothermic and normothermic groups; $*** p < 0.001$; $** p < 0.01$, $* p < 0.05$; ns, not significant; ANOVA).

Synthesis of lactate and alanine

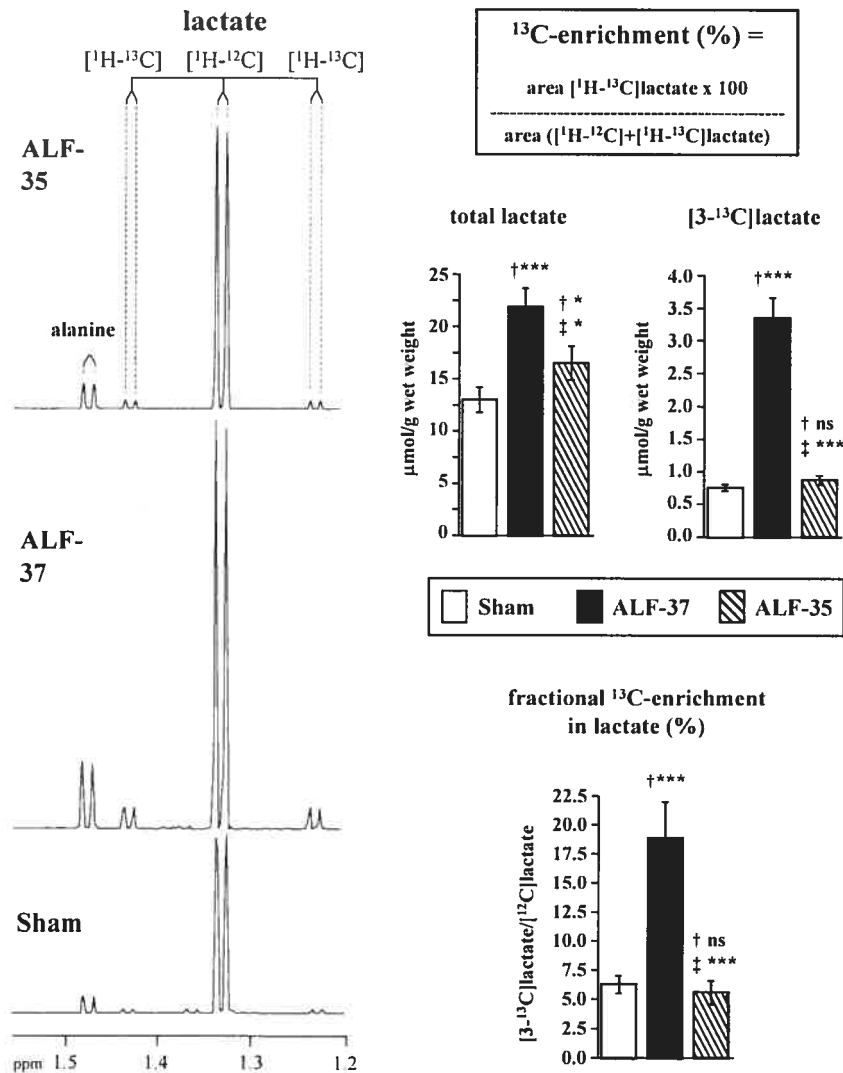


Figure 4: Brain lactate synthesis in ALF: effect of hypothermia.

Left: segments of ¹H-NMR spectra of brain extracts from frontal cortex of a sham-operated control rat compared with rats with ALF maintained at 37 °C (ALF-37) or 35 °C (ALF-35). Peak assignments. The percentage ¹³C-enrichment in lactate (indicating *de novo* synthesis) was calculated according to the formula in the upper right. *Bottom, right:* Changes in the concentrations, amounts of ¹³C-labeled lactate and fractional ¹³C-enrichments in lactate in rats with ALF compared with sham-operated control rats. For statistical analysis, see legend Figure 3.

In normothermic rats, ALF resulted in an increase of lactate and alanine total concentrations ($[^{12}\text{C}] + [^{13}\text{C}]$) to $169.2\% \pm 15.6$ and $267.3\% \pm 34.0\%$ ($P < 0.001$), respectively, which was both partially prevented by mild hypothermia (increase to $131.1\% \pm 16.6\%$ and $154.2\% \pm 18.6\%$, respectively) (6 animals were used for each group) (Figure 4 and 5). Furthermore, the resonance of ^{13}C -labeled lactate (synthesized from $[1-^{13}\text{C}]$ glucose), showing an additional doublet splitting arising from ^1H - ^{13}C coupling, can be distinguished from the unlabeled isotopomer (synthesized from substrates other than $[1-^{13}\text{C}]$ glucose) (Figure 4). During coma stages of encephalopathy, the concentration of ^{13}C -labeled lactate increased to a much higher concentration (to $446.5\% \pm 48.7\%$ compared with sham-operated controls) ($P < 0.001$) compared with its total, resulting in 3 fold increased fractional ^{13}C -enrichment in lactate. In hypothermic ALF rats, *de novo* synthesized ^{13}C -labeled lactate was not significantly different from sham-operated control values. Thus, hypothermia led to a selective reduction of *de novo* synthesis of ^{13}C -labeled lactate ($P < 0.001$). No significant changes in $[3-^{13}\text{C}]$ lactate were observed in blood plasma of ALF rats 15 min after injection of $[1-^{13}\text{C}]$ glucose ($n=6$).

^{13}C -labeled alanine was quantified from ^{13}C -NMR spectra (Figure 5). As observed for lactate synthesis, ALF resulted in a marked increase of *de novo* synthesis of $[3-^{13}\text{C}]$ alanine to $707.9\% \pm 65.7$ ($P < 0.001$; $n=6$) at coma stages, which was significantly reduced under hypothermic conditions (increased to $171.1\% \pm 20.7\%$; $n=6$). Interestingly, the fractional ^{13}C -enrichment in $[3-^{13}\text{C}]$ alanine, was increased under normothermic conditions, but remained within normal limits in hypothermic animals ($n=6$) (Figure 6).

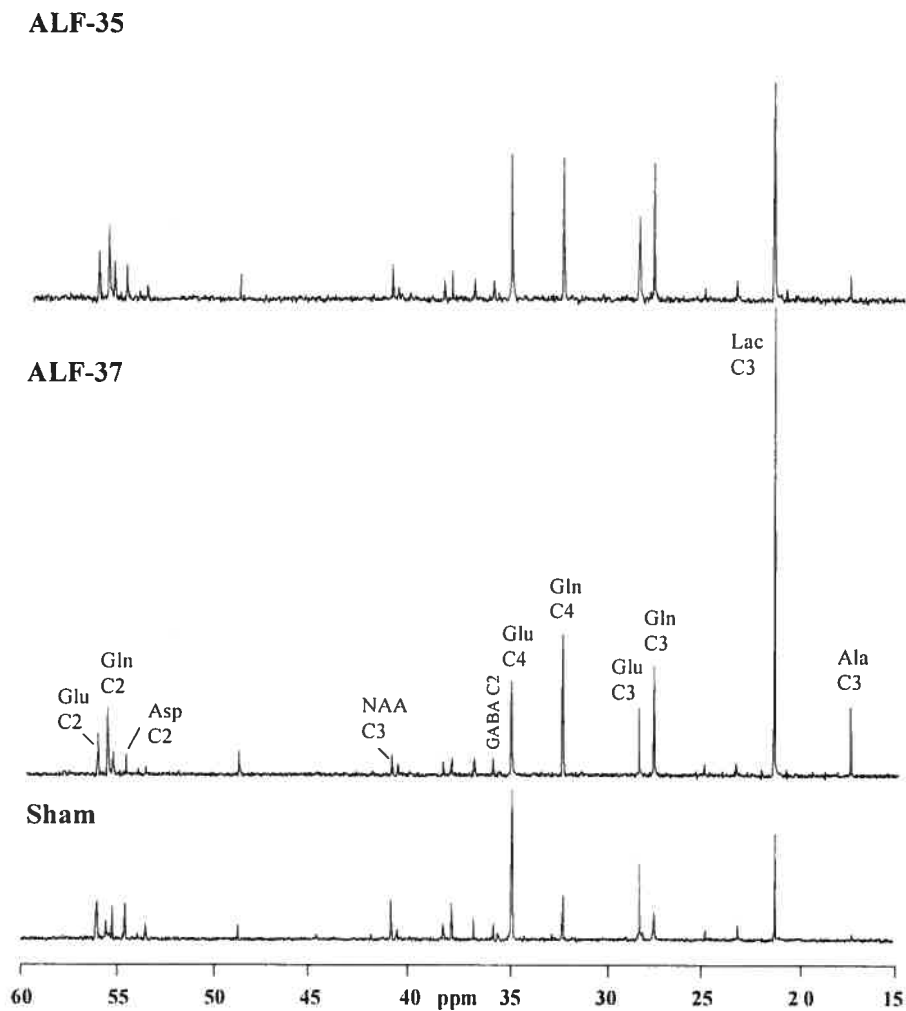


Figure 5: ^{13}C -NMR Spectra of brain extracts from rats with ALF: effect of hypothermia.

Figure shows ^{13}C -NMR spectra of extracts from frontal cortex of a sham-operated control compared with rats with ALF maintained at 37 °C (ALF-37) or 35 °C (ALF-35) 15 min after injection of $[1-^{13}\text{C}]$ -glucose. Peak assignments: Ala: alanine; GABA: γ -aminobutyric acid; Glu: glutamate; Gln: glutamine; Lac: lactate; NAA: N-acetyl-aspartate (signals of NAA are due to naturally abundant ^{13}C -labeled NAA).

This preferential increase of ^{13}C -labeled alanine and the selective protective effect of hypothermia on elevated ^{13}C -label incorporation from $[1-^{13}\text{C}]\text{glucose}$ into alanine, closely resembles the changes observed for ^{13}C -labeled lactate.

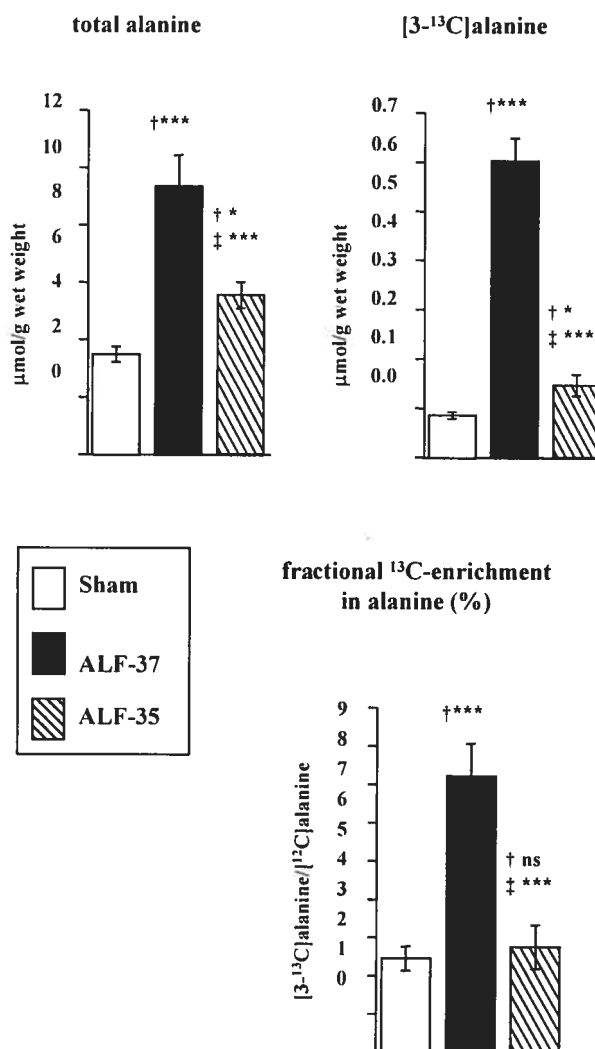


Figure 6: Brain alanine synthesis in ALF: effect of hypothermia.

Figure shows changes in the concentration, amount of ^{13}C -labeled alanine, and fractional ^{13}C -enrichments in alanine in frontal cortex of rats with ALF maintained at 37 °C (ALF-37) or 35 °C (ALF-35) compared with sham-operated controls. For statistical analysis, see legend to Figure 3.

Labeling of Tricarboxylic acid cycle-related metabolites from [1-¹³C]glucose.

Synthesis of glutamine, glutamate, and GABA ¹³C-resonances were quantified from ¹³C-NMR (Figure 5). Six animals were used in each group (sham-operated controls, normothermic and hypothermic ALF rats) for ¹³C-NMR analysis.

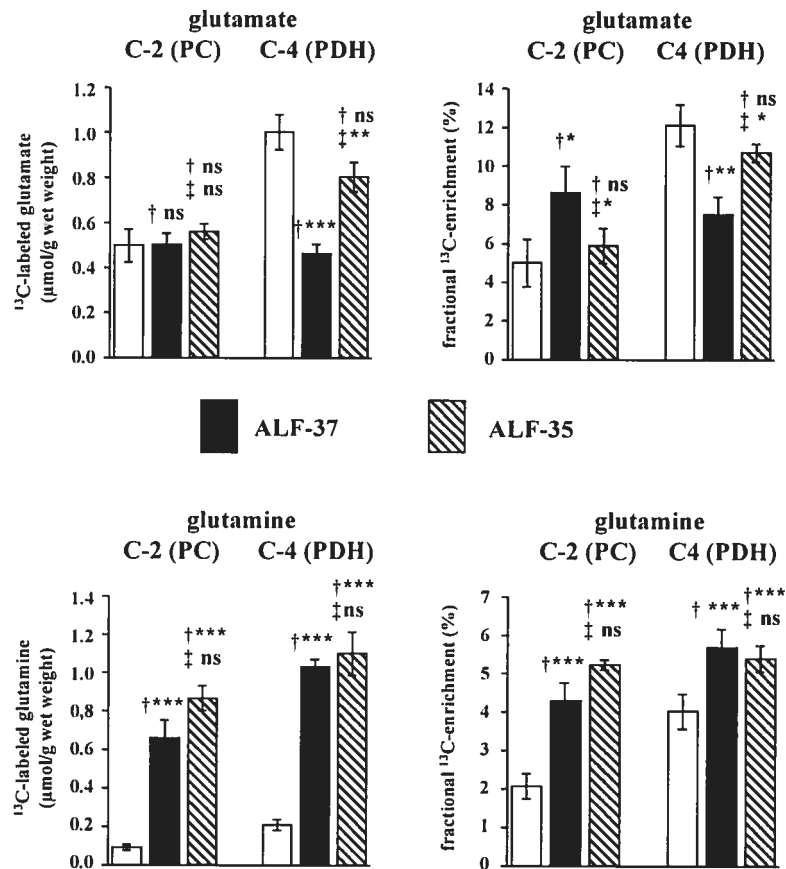


Figure 7: Synthesis of brain glutamate and glutamine in ALF: effect of hypothermia. Figure shows changes in the absolute amounts of ¹³C ($\mu\text{mol/g tissue}$) (*left*) and in the percentage ¹³C-enrichments (*right*) in individual carbon positions (via the PC- and PDH pathways) of glutamate and glutamine labeled 15 min after injection of [1-¹³C]glucose calculated from ¹³C-NMR spectra of extracts from frontal cortex of rats with ALF maintained at 37 °C (ALF-37) or 35 °C (ALF-35) compared with sham-operated controls. For statistical analysis, see legend to Figure 3.

The total amounts of ^{13}C -label ($\mu\text{mol/g}$ tissue) and the fractional ^{13}C -enrichments (%) in these amino acids are presented in Figure 7. The increase in *de novo* synthesis of glutamine from $[1-^{13}\text{C}]$ glucose is much higher than the increase of its pool size at coma stages. ^{13}C -isotopomer analysis of the individual carbon positions in glutamine revealed a greater increase of C-2 labeled glutamine (to $718.5\% \pm 16.7\%$; $P < 0.001$) compared with C-4 (to $500.8\% \pm 80.3\%$; $P < 0.001$).

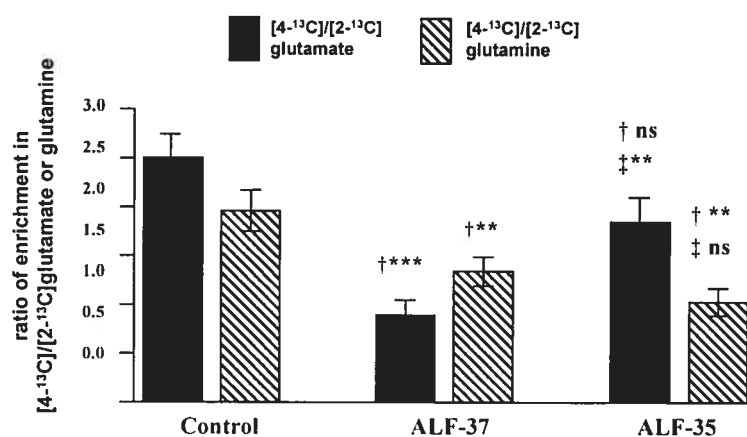


Figure 8: Relative contribution of carbon flux through PDH and PC: Ratios in C-4/C-2 of glutamate and glutamine from ^{13}C -NMR spectra of extracts from frontal cortex of sham-operated control rats compared with rats with ALF maintained at 37 °C (ALF-37) or 35 °C (ALF-35). For statistical analysis, see legend to Figure 3.

Unlike the selective prevention of abnormal lactate synthesis from [1-¹³C]glucose by mild hypothermia, the increase of ¹³C-labeled glutamine did not differ significantly between normothermic and hypothermic ALF groups. In normothermic ALF rats, a relatively higher decrease of [4-¹³C]glutamate (through PDH pathway) compared with its pool size resulted in a decreased relative ¹³C enrichment in C-4 of glutamate 62.3% ± 10.7% of control ($P < 0.001$). Although hypothermia failed to prevent the increased glutamine synthesis, it led to a complete recovery selectively of PDH-mediated glutamate synthesis. The prevention of impaired influx of glucose through PDH by hypothermia is reflected also by the prevention of the decrease in the ratio of C-4/C-2 ratio in glutamate (but without significant changes of C-4/C-2 in glutamine in hypothermic compared with normothermic rats), which was calculated as a measure of the relative glucose oxidative metabolism (vs. the anaplerotic pathway) (Figure 8). No changes were observed for *de novo* synthesized GABA in either normothermic or hypothermic groups of rats with ALF (data not shown).

DISCUSSION

Results of the present study reveal that mild hypothermia delays the onset of encephalopathy and brain edema and selectively prevents alterations in energy and glucose metabolism in frontal cortex of rats with experimental ALF. In particular, hypothermia prevents the increase in brain lactate. These findings add to an accumulating body of evidence to suggest that increased brain lactate production is causally related to the encephalopathy and brain edema in ALF. Other evidence in support of this possibility includes the report of a significant correlation between brain lactate concentrations and encephalopathy grade (Mans et al., 1994) and EEG

changes (Deutz et al., 1988) in experimental ALF. Results of *in vitro* studies also support a key role of lactate in the pathogenesis of astrocyte swelling. For example, it was previously shown that exposure of primary cultures of rat astrocytes (the cell type shown to selectively exhibit swelling in brain in ALF) to pathophysiologically relevant concentrations of lactate manifest significant swelling (Staub et al., 1990). A recent report advocates the use of a non-invasive technique to measure brain lactate *in vivo* as an evaluation of advanced encephalopathy in ALF (Nyberg et al., 1998). Results of the present study now show that the selective attenuation of ALF-related increases of lactate and alanine in frontal cortex, concomitant with the prevention of encephalopathy and brain edema, resides in the ability of hypothermia to prevent *de novo* synthesis of lactate from glucose.

It should be borne in mind, however, that, although there is convincing evidence, both from the present and previous studies, for decreased glucose oxidation and lactate/alanine accumulation in the brain in ALF, there is no evidence to suggest that either encephalopathy or brain edema are consequences of diminished ATP synthesis (McCandless et al., 1981; Matsuoka et al., 1990; Bates et al., 1988). The present ^{13}C -NMR spectroscopic study is novel by virtue of its ability to differentiate between metabolite concentrations and metabolic fluxes. In particular, the present findings suggest that one important mechanism of action of hypothermia in ALF is the facilitation of pyruvate oxidation as a consequence of decreased blood-brain transfer of ammonia, which has been shown to inhibit the tricarboxylic acid cycle (TCA) enzyme α -ketoglutarate dehydrogenase (Lai et al., 1991). Increased glycolytic

activity has then to compensate to maintain ATP production with consequent increases of brain lactate and alanine.

Decreased brain tissue concentrations of glutamate and aspartate have consistently been reported in both experimental (Zwingmann et al., 2003; Mans et al., 1994; Voorhies et al., 1983; Swain et al., 1992; Bosman et al., 1990) and human (Record et al., 1976) ALF. Results of the present study show that mild hypothermia prevents the reduction of brain glutamate and aspartate associated with experimental ALF. Furthermore, analysis of isotopomer patterns from the ^{13}C -NMR spectra reveals that hypothermia leads to a normalization of the *de novo* synthesis of glutamate via pyruvate dehydrogenase, a key enzyme for oxidative and energy metabolism in the brain, which is expressed in both astrocytes and neurons. Glutamate and aspartate are not only potent excitatory neurotransmitters in that both are involved in brain energy metabolism, serving as substrates/intermediates in the malate-aspartate shuttle (responsible for the transfer of reducing equivalents from the cytosol to the mitochondria). Reduced availability of glutamate or aspartate in either cell type therefore could result in mitochondrial energy compromise. In the case of glutamate, studies using *in vivo* cerebral microdialysis have shown that increased release of glutamate in experimental ALF (Michalak et al, 1996) is sensitive to hypothermia (Rose et al., 2000). Furthermore, the aspartate derivative N-acetylaspartate (NAA), present in high concentrations in the brain, is decreased in frontal cortex at coma stages of encephalopathy under normothermic conditions but is prevented by hypothermia. NAA is a neuronal marker molecule and is involved in brain energy metabolism (Clark et al., 1998). Decreased brain concentrations of NAA, therefore, are consistent with neuronal mitochondrial dysfunction in ALF.

In contrast to glutamate and aspartate, ALF because of hepatic devascularization does not result in alterations in either absolute concentrations or synthesis of the inhibitory amino acid GABA. These findings add to a convincing body of evidence that the neural inhibition in both human and experimental ALF (Zwingmann et al., 2003; Mans et al., 1994; Voorhies et al., 1983; Record et al., 1976) is not the consequence of altered GABA synthesis in the brain.

It was previously suggested that brain edema in hyperammonemic syndromes such as ALF is the consequence of increased intracellular accumulation of glutamine by the astrocytes (Cordoba et al., 1996). In favor of this hypothesis were reports of increased intracranial pressure in primates infused with ammonia (Voorhies et al., 1983) and of increased brain glutamine concentrations in both human (Record et al., 1976) and experimental (Swain et al., 1992; Bosman et al., 1990) ALF. Moreover, brain edema because of ammonia infusions was partially prevented by pretreatment with methionine sulfoximine (MSO), a potent glutamine synthetase inhibitor (Cordoba et al., 1996; Takahashi et al., 1991). However, MSO treatment may exert multiple effects. For example, MSO also induces massive efflux of glutamine from astrocytes in cultures (Albrecht et al., 1990). In addition, brain glutamine accumulation also occurs in chronic liver failure a condition not normally associated with brain edema or its clinical consequences (Cordoba et al., 1996; Albrecht et al., 2001). Therefore, despite several experimental data supporting glutamine as accumulating osmolyte in HE, whether or not glutamine accumulation is a major cause for the development of brain edema in ALF is uncertain (Albrecht et al., 2001). Results of the present study confirm an increase in brain glutamine in ALF rats. However, mild hypothermia sufficient to abolish brain edema in these animals did not

prevent either the increase in brain glutamine concentration or its *de novo* synthesis from glucose in astrocytes (i.e., *de novo* synthesis via the astrocytic enzymes pyruvate carboxylase and glutamine synthetase). A limited capacity of glutamine synthetase was also concluded by Deutz et al., 1988, who demonstrated a faster increase of brain ammonia compared with glutamine and by Bosman et al., 1992, who observed, after an initial increase of extracellular glutamine during mild HE, a subsequent decrease during severe HE. Direct demonstration of lack of correlation between the grade of hepatic encephalopathy and glutamine synthetase activity was initially reported by Kanamori et al., 1996, using *in vivo* ^1H MRS in a hyperammonemic model. Moreover, a previous ^{13}C -NMR study could find no significant correlation between brain *de novo* glutamine synthesis from glucose and grade of encephalopathy or brain edema at coma stages in the hepatic devascularized rats (Zwingmann et al., 2003).

In light of the apparently limited capacity of glutamine synthetase, which is thought to be the main detoxification process of ammonia, the question remains of how the brain cells regulate the disposal of excess ammonia in late stages of ALF. In this regard, it has been shown that ammonia can be incorporated into alanine after transamination of glutamate by alanine aminotransferase (ALAT) in both astrocytes and neurons. Consistent with this possibility, alanine has been found to be elevated in the hyperammonemic brain (Mans et al., 1994; Swain et al., 1992; Hilgier et al., 1999). Results of the present study show for the first time that *de novo* alanine synthesis from glucose is increased as a function of the degree of encephalopathy/brain edema in ALF, which is partly prevented by mild hypothermia. Like lactate formation, synthesis of alanine via ALAT may supplement glycolytic

activity, enabling cytosolic ATP production by regeneration of NAD^+ via subsequent reamination of α -ketoglutarate by glutamate dehydrogenase (GDH). It is noteworthy that, in the honeybee retina, which lacks lactate dehydrogenase activity, alanine synthesis in glia fixes ammonia at a rate exceeding glutamine formation (Tsacopoulos et al., 1997), suggesting that ALAT and GDH may operate in a complementary manner to oxidize NADH and fix ammonia. Like glutamine, alanine accumulation may increase the cellular content of osmotically active substances, leading to water uptake, cell swelling, and brain edema in ALF. Furthermore, it has been shown that both alanine and glutamine induce hepatocyte swelling (Haussinger., 1996), and, in acute HE, a close correlation between CSF alanine with both the degree of neurologic dysfunction (Mans et al., 1994) and edema (Swain et al., 1992) was demonstrated, suggesting that increased alanine synthesis may be related to the pathogenesis of brain edema in ALF.

Together, these findings do not support a major role for the accumulation of intracellular glutamine in the astrocyte as a cause of brain edema due to ALF. The imperfect correlation of glutamine with brain edema and severity of encephalopathy points to additional mechanisms contributing to brain edema at coma stages. Elevated concentration and synthesis of alanine, which is selectively prevented by mild hypothermia, may play a key role in the development of brain edema in ALF. In addition, the correlation between increased glucose flux through the glycolytic pathway (alanine and lactate *de novo* synthesis) and the severity of encephalopathy and brain edema suggest that a deficit in glucose oxidation and energy metabolism is

a major contributor of these neurologic complications of ALF and provide a rational argument for the further use of hypothermia in its management.

ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by the grant from The Canadian Institutes of Health Research. Dr. Zwingmann is a recipient of research awards from the Quebec Ministry of Education and the Deutsche Forschungsgemeinschaft, Germany.

REFERENCES

Albrecht J, Dolinska M. (2001). Glutamine as a pathogenic factor in hepatic encephalopathy. *J Neurosci Res.* Jul 1;65(1):1-5.

Albrecht J, Norenberg MD. (1990). L-methionine-DL-sulfoximine induces massive efflux of glutamine from cortical astrocytes in primary culture. *Eur J Pharmacol.* Jul 17;182(3):587-9.

Bates TE, Williams SR, Busza AL, Gadian DG, Proctor E. (1988). A ^{31}P nuclear magnetic resonance study in vivo of metabolic abnormalities in rats with acute liver failure. *NMR Biomed.* 1(2):67-73.

Blei AT. (1991). Cerebral edema and intracranial hypertension in acute liver failure: distinct aspects of the same problem. *Hepatology*; 13(2):376-9.

Bosman DK, Deutz NE, De Graaf AA, vd Hulst RW, Van Eijk HM, Bovee WM, Maas MA, Jorning GG, Chamuleau RA. (1990). Changes in brain metabolism during hyperammonemia and acute liver failure: results of a comparative ^1H -NMR spectroscopy and biochemical investigation. *Hepatology.* 12(2):281-90.

Bosman DK, Deutz NE, Maas MA, van Eijk HM, Smit JJ, de Haan JG, Chamuleau RA. (1992). Amino acid release from cerebral cortex in experimental acute liver failure, studied by in vivo cerebral cortex microdialysis. *J Neurochem.* Aug;59(2):591-9.

Chatauret N, Rose C, Therrien G, Pannunzio M and Butterworth RF. (2001). Mild hypothermia prevents cerebral edema and CSF lactate accumulation in acute liver failure. *Metab. Brain Dis.* 16: 95-102.

Clark JB. (1998). N-acetyl aspartate: a marker for neuronal loss or mitochondrial dysfunction. *Dev Neurosci.* 20(4-5):271-6.

Clemmensen JO, Larsen FS, Kondrup J, Hansen BA, Ott P. (1999). Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology.* 29: 648-653.

Cordoba J and Blei AT. (1996). Brain edema and hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* 16:271-280.

Deutz NEP, De Graaf AA, De Haan JG, Bovée WMMJ and Chamuleau RAFM. (1988). In vivo brain 1H-NMR spectroscopy (1H-NMRS) during acute hepatic encephalopathy (HE). In (P.B. Soeters, J.H.P., Wilson, A.J., Meijer, and E. Holm, eds) *Advances in Ammonia Metabolism and Hepatic Encephalopathy*, Chap. 57, Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 439-446.

Dienst SG. (1961). An ion exchange method for plasma ammonia concentration. *J. Lab. Clin. Med.* 58: 149-155.

Haussinger D. (1996). Regulation and functional significance of liver cell volume. *Prog Liver Dis.* 14:29-53.

Hilgier W, Zielinska M, Borkowska HD, Gadamski R, Walski M, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J. (1999). Changes in the extracellular profiles of neuroactive amino acids in the rat striatum at the asymptomatic stage of hepatic failure. *J Neurosci Res.* Apr 1;56(1):76-84.

Jalan R, Dalmink SWM, Olde Lee A, and Hayes PC. (1999). Moderate hypothermia for uncontrolled intracranial hypertension in acute liver failure. *Lancet* 354: 1164-1168.

Kanamori K, Ross BD, Chung JC, Kuo EL. (1996). Severity of hyperammonemic encephalopathy correlates with brain ammonia level and saturation of glutamine synthetase *in vivo*. *J Neurochem.* Oct;67(4):1584-94.

Knecht K, Michalak A, Rose C, Rothstein JD, Butterworth RF. (1997). Decreased glutamate transporter (GLT-1) expression in frontal cortex of rats with acute liver failure. *Neurosci Lett.* 25: 1032-1034.

Kosenko E, Kaminsky Y, Grau E, Minana MD, Marcaida G, Grisolia S, Felipe V. (1994). Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. *J Neurochem.* 63(6):2172-8.

Lai JC, Cooper AJ. (1991). Neurotoxicity of ammonia and fatty acids: differential inhibition of mitochondrial dehydrogenases by ammonia and fatty acyl coenzyme A derivatives. *Neurochem Res.* Jul;16(7):795-803.

Lee SH, Fischer B. (1961). Portacaval shunt in the rat. *Surgery*, 50: 668-672.

Mans AM, DeJoseph MR and Hawkins RA. (1994). Metabolic abnormalities and grade of encephalopathy in acute hepatic failure. *J Neurochem.* 63: 1829-1838.

Marmarou A, Poll W, Bhagavan H. (1978). A simple gravimetric technique for measurement of cerebral edema. *J. Neurosurg* **49**: 530-537.

Matsuoka M, Igisu H, Kohriyama K, Inoue N. (1990). Effects of ammonia on brain energy metabolites-dose-dependent alterations. *J Neurochem.* Jul;**55**(1):354-5.

McCandless DW, Schenker S. (1981). Effect of acute ammonia intoxication on energy stores in the cerebral reticular activating system. *Exp Brain Res.* **44**(3):325-30.

Michalak A, Rose C, Butterworth J, Butterworth RF. (1996). Neuroactive amino acids and glutamate (NMDA) receptors in frontal cortex of rats with experimental acute liver failure. *Hepatology.* **24**(4):908-13.

Nyberg SL, Cerra FB, Gruetter R. (1998). Brain lactate by magnetic resonance spectroscopy during fulminant hepatic failure in the dog. *Liver Transpl. Surg.* **4**(2): 158-165.

Rao KV, Norenberg MD. (2001) Cerebral energy metabolism in hepatic encephalopathy and hyperammonemia. *Metab Brain Dis.* **16**(1-2):67-78.

Record CO, Buxton B, Chase RA, Curzon G, Murray-Lyon IM, Williams R. (1976). Plasma and brain amino acids in fulminant hepatic failure and their relationship to hepatic encephalopathy. *Eur J Clin Invest.* **6**(5):387-94.

Rose C, Michalak A, Pannunzio M, Chatauret N, Rambaldi A and Butterworth RF. (2000). Mild hypothermia delays the onset of coma and prevents brain edema and extracellular brain glutamate accumulation in rats with acute liver failure. *Hepatology* **31**: 872-877.

Staub F, Baethmann A, Peters J, Weigt H, Kempfski O. (1990). Effects of lactacidosis on glial cell volume and viability. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* **10**: 866-876.

Swain M., Butterworth RF, Blei, AT. (1992). Ammonia and related amino acids in the pathogenesis of brain edema in acute ischemic liver failure in rats. *Hepatology*. **15**: 449-453.

Szerb JC, Butterworth RF. (1992). Effect of ammonium ions on synaptic transmission in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*. **39**(2):135-53.

Takahashi H, Koehler RC, Brusilow SW, Traystman RJ. (1991). Inhibition of brain glutamine accumulation prevents cerebral edema in hyperammonemic rats. *Am J Physiol. Sep*; **261**(3 Pt 2):H825-9.

Traber P, DalCanto M, Ganger D, Blei AT. (1989). Effect of body temperature on brain edema and encephalopathy in the rat after hepatic devascularization. *Gastroenterology* **96**: 885-891.

Tsacopoulos M, Poitry-Yamate CL, Poitry S, Perrottet P, Veuthey AL. (1997). The nutritive function of glia is regulated by signals released by neurons. *Glia*. *Sep*; **21**(1):84-91.

Voorhies TM, Ehrlich ME, Duffy TE, Petito CK, Plum F. (1983). Acute hyperammonemia in the young primate: physiologic and neuropathologic correlates. *Pediatr Res*. **17**(12):970-5.

Zwingmann C, Chatauret N, Leibfritz D, Butterworth RF. (2003). Selective increase of brain lactate synthesis in experimental acute liver failure: results of a [¹H-¹³C]-Nuclear Magnetic Resonance study. *Hepatology*, **37**:420-428.

Zwingmann C., Richter-Landsberg C., Brand A., Leibfritz D. (2000). NMR spectroscopy study on the metabolic fate of [3-¹³C]alanine in astrocytes, neurons, and cocultures: implications for glia-neuron interactions in neurotransmitter metabolism. *Glia*. **32**:286-303.

4. ARTICLE 4 :

DIRECT MOLECULAR AND SPECTROSCOPIC EVIDENCE FOR INCREASED AMMONIA REMOVAL CAPACITY OF SKELETAL MUSCLE IN ACUTE LIVER FAILURE

Journal of Hepatology (accepted).

Nicolas Chatauret, Paul Desjardins, Claudia Zwingmann, Christopher Rose, V.K. Rama Rao, and Roger F. Butterworth

Neuroscience Research Unit, CHUM (Hôpital Saint-Luc), Montréal, Québec, Canada
H2X 3J4.

Abbreviations: GS, glutamine synthetase; ALF, acute liver failure; HAL, hepatic artery ligation; Gln, glutamine; Lac, lactate; A-V, arterio-venous, PA: Perchloric acid.

ABSTRACT

Background/Aims: It has been proposed that, in acute liver failure, skeletal muscle adapts to become the principle organ responsible for removal of blood-borne ammonia by increasing glutamine synthesis, a reaction that is catalyzed by the cytosolic ATP-dependent enzyme glutamine synthetase. To address this issue, glutamine synthetase expression and activities were measured in skeletal muscle of rats with acute liver failure resulting from hepatic devascularization. *Methods:* Glutamine synthetase protein and gene expression were investigated using immunoblotting and semi-quantitative RT-PCR analysis. Glutamine synthetase activity and glutamine *de novo* synthesis were measured using, respectively, a standard enzymatic assay and [¹³C]-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Results:* Glutamine synthetase protein (but not gene) expression and enzyme activities were significantly up-regulated leading to increased *de novo* synthesis of glutamine and increased skeletal muscle capacity for ammonia removal in acute liver failure. In contrast to skeletal muscle, expression and activities of glutamine synthetase in brain were significantly decreased. *Conclusions:* These findings demonstrate that skeletal muscle adapts, through a rapid induction of glutamine synthetase, to increase its capacity for removal of blood-borne ammonia in acute liver failure. Maintenance of muscle mass together with the development of agents with the capacity to stimulate muscle glutamine synthetase could provide effective ammonia-lowering strategies in this disorder.

INTRODUCTION

Circulating ammonia concentrations in the 250-600 μ M range have consistently been reported in both experimental and human acute liver failure (ALF) and increased arterial ammonia concentrations have been proposed as a predictor of brain herniation and mortality in ALF patients (Clemmesen et al. 1999). Brain ammonia may reach millimolar concentrations in ALF and such concentrations are well established to have deleterious effects on cerebral metabolism and function (Szerb and Butterworth 1992).

Under normal physiological conditions, ammonia detoxification relies almost exclusively on hepatic urea and glutamine synthesis by periportal and perivenous hepatocytes respectively. ALF resulting from either toxic liver injury or viral hepatitis results in a serious compromise of hepatocyte integrity with consequent increases of circulating ammonia. A number of studies have provided evidence that skeletal muscle becomes the major organ responsible for removal of excess blood-borne ammonia in cirrhotic patients (Ganda and Ruderman 1976) as well as in animal models of chronic liver failure (Girard and Butterworth 1992b; Desjardins et al. 1999). However, evidence that a similar response occurs in ALF is limited.

The objective of the present study was the assessment of the capacity of skeletal muscle compared to brain (a second organ with the potential to remove ammonia) to increase its capacity to remove increased blood-borne ammonia in ALF. Four approaches based upon molecular, spectroscopic and hemodynamic measurements were undertaken namely (1) Measurement of glutamine synthetase (GS) mRNA and protein, (2) measurement of GS enzyme activities, (3) measurement of ammonia and glutamine metabolic fluxes and (4) direct spectroscopic

measurement of *de novo* glutamine synthesis in experimental ALF. The devascularized rat model of ALF was used for the studies described since this model recapitulates the pathologic, metabolic and neurologic features of human ALF including sustained hyperammonemia, loss of perivascular and periportal hepatocytes and neurological manifestation such as brain edema and encephalopathy (Blei A.T. et al. 1992). Studies were undertaken 6h following hepatic devascularization, prior to the onset of brain edema or severe encephalopathy in order to minimize confounding effects of these complications on cerebral metabolism.

MATERIAL AND METHODS

Animal surgery.

Male Sprague-Dawley rats (175-200g) were anesthetized with isoflurane, and an end-to-side portacaval anastomosis was performed according to the guidelines of Lee and Fisher (Lee and Fisher 1961) and as previously described (Chatauret et al. 2001). Total surgery time was <15 min. Sham-operated control rats, matched for weight, were similarly anesthetized and the inferior vena cava was clamped for 15 min. Following surgery, all animals were individually housed with free access to food and water under constant conditions of temperature, humidity, and light cycles.

24 hours after portacaval anastomosis or laparotomy, rats were reanesthetized and subjected to hepatic artery ligation (HAL) and all animals were sacrificed 6 h after HAL. All surgical procedures were performed in accordance with the Guidelines of Canadian Council of Animal care and were approved by Animal Research Committee of C.H.U.M.

Measurement of organ blood flow.

6 hours post-HAL or sham operation, animals were anesthetized with isoflurane and body temperature was maintained at 37 °C with a CMA 150 temperature controller (CMA microdialysis, Stockholm, Sweden). A PE-10 catheter (Intramedic Clay Adams, Becton Dickinson, Sparks, MD) was placed in the right carotid artery and advanced into the left ventricle as previously described (Yang et al. 2002). Correct positioning in the left ventricle was verified by hemodynamic monitoring. A PE-50 catheter (Intramedic Clay Adams, Becton Dickinson, Sparks, MD) was placed in the left femoral artery. Total time for catheter placement was less than 15 min.

Blood flow was measured using the radioactive microsphere technique as previously described (Heymann et al. 1977b). Before sacrifice, $1 - 1.2 \times 10^5$ microspheres ($15 \pm 2 \mu\text{m}$) labeled with ^{85}Sr (Perkin Elmer, Boston, MA) in 0.7 mL of saline 0.05% Tween 80 (Sigma Aldrich, St-Louis, MO) were sonicated for 30 min and injected over a 15 sec period into the left ventricle to determine the hind limb muscle blood flow. Just before injection, withdrawal of blood from the femoral arterial catheter was started at a rate of 0.786 mL/min (Harvard pump, Mills, MA) and collected in a heparinized glass syringe for a total time of 1.25 min.

At sacrifice, left and right kidneys, and right hind limb muscles (posterior-medial and lateral thigh, muscles) were rapidly removed, weighed, pooled and counted. Right and left renal blood flow and skeletal muscle flow were calculated from the radioactivity measured in those tissues using a gamma counter according to the formula described previously (Heymann et al. 1977a):

$$\text{Blood flow (ml/min/ 100g of tissue)} = \frac{0.786 \times [\text{cpm tissue}]}{[\text{cpm blood}] \times [\text{Tissue weight}]} \times 100$$

Agreement between right and left kidney flow ($\leq 20\%$ difference) indicated adequacy of the microsphere injection.

Tissue sampling for arterio-venous differences.

Following the microsphere procedure, femoral veins and arteries of the right hind limb were exposed, arterial and venous blood samples were taken by heparinized syringes (1 mL, 25G needle). 0.5 mL of arterial and venous blood was taken and immediately centrifuged to separate the plasma for determination of arterio-venous differences for ammonia and glutamine across the right hind limb.

Measurement of plasma ammonia.

Plasma ammonia levels were measured using a commercial ammonia test kit, based on an ion exchange method, followed by colorimetric measurement of ammonia nitrogen with the Bertholet phenate-hypochlorate reaction (Dienst., 1961).

Measurement of plasma glutamine.

Glutamine concentrations were measured in femoral arterial and venous plasma samples using a Perkin-Elmer reverse phase HPLC system with fluorescence detection and precolumn *o*-phthalaldehyde derivatization, as previously described (Michalak et al. 1996).

Measurement of tissue glutamine synthetase activity.

Groups of rats were sacrificed by decapitation. Brains were rapidly removed and dissected on ice and 1 g of postero-medial and lateral thigh muscle was snap frozen. All tissue samples were stored at -70°C until use. Glutamine synthetase (EC6.3.1.2) activity was measured in tissue homogenates as previously described with minor modifications (Girard and Butterworth 1992a). Briefly, cerebral cortical and skeletal muscle samples were homogenised (20% wt/vol) using a Teflon pestle in Tris-EDTA buffer (pH 7.4), and homogenates were centrifuged at 10,000 g for 10 min. The supernatant (0.1 mL) was preincubated at 37°C for 10 min in an assay mixture containing 100 mM imidazole (pH 7.2), 12.5 mM MgCl_2 , 20 mM mercaptoethanol, 10 mM ATP, 4 mM ammonium chloride, 13 mM phosphoenolpyruvate, 50 units of pyruvate kinase and 0.16% Triton X-100. The reaction was started by adding 2 μCi of $[1-^{14}\text{C}]$ -glutamate (specific activity 60 mCi/mmol, Perkin Elmer, Boston, MA) diluted with cold glutamate to a final concentration of 50 mM for skeletal muscle and 20 mM for cerebral cortex. After incubation at 37°C for 60 min (30 min for muscle) the reaction was terminated by adding 1 mL ice-cold water and the mixture was immediately passed through a column (3 cm x 0.7 cm) containing anion exchange resin (Dowex AG-1X8, acetate form). $[1-^{14}\text{C}]$ -glutamate was quantitatively retained on the ion exchange column. Protein content of homogenates was determined by the method of Lowry (Lowry et al. 1951). Enzyme activities were expressed as μmoles of glutamine formed per h per mg of protein.

GS gene expression (RT-PCR)***RNA extraction.***

Total RNA was extracted using TRI Reagent (MRC Inc., Ohio) according to the manufacturer's protocol. Putative contaminating DNA was eliminated by adding 100 U of RNase-free DNase I per 50 µg of total RNA at 37°C for 1 hour. Purified RNA was then extracted with phenol, precipitated with ethanol and resuspended in diethylpyrocarbonate-treated water. RNA samples were stored at -70°C until use.

RT-PCR analysis.

Glutamine synthetase expression was measured by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using the same forward and reverse primer sequences and reactions conditions as previously described (Desjardins et al. 1999).

GS protein analysis (Western Blot).

Tissue samples were homogenised in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate), and a protease inhibitor mixture consisting of 1 mM EDTA, 0.1 µM pepstatin A, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml aprotinin, and 100 µg/ml phenylmethyl-sulfonyl fluoride. After centrifugation at 12,000 g for 15 min, samples (50 µg protein) were boiled for 10 min in loading buffer (50 mM Tris-HCl, pH6.8, 10% glycerol; 2% SDS, 0.1 M dithiothreitol, 0.1% bromophenol blue). Proteins were resolved by 8% denaturing SDS-polyacrylamide gels and transferred overnight to nitrocellulose membranes. Ponceau staining was used to ensure equal protein loading. The membranes were blocked for 2 h in Tris-buffered saline containing 5% dried milk and 0.1% Tween 20

(TBST), then incubated for 1 h with a monoclonal antibody directed against rat GS (Transduction Laboratories, Lexington, KY). Blots were subsequently probed with anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated antiserum (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) diluted 1/12,000 in the same buffer. After extensive washing with TBST, the peroxidase activity was detected by chemiluminescence using the Renaissance detection system (PerkinElmer, Boston, MA) and quantified by densitometric scanning.

¹H-¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic studies.

Groups of hepatic devascularized rats 6 h post-HAL and their paired sham-operated controls were administered [¹³C]-glucose (400 mg/kg, i.p.; Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA) and were killed exactly 20 min later by decapitation. Arterial blood glucose levels were continuously monitored and measured by mean of a glucometer using the glucose dehydrogenase method. Glucose was administered subcutaneously as needed to maintain normoglycemia. Immediately after sacrifice, samples of postero-medial and lateral thigh muscle were snap-frozen, powdered over liquid nitrogen, and homogenized in 15 mL of a 12% PA solution at 0 °C using a motor-driven polished glass tube-Teflon pestle homogenizer. The homogenates were centrifuged at 40,000 g for 15 min; the supernatants were placed in an ice bath and neutralized to pH = 7.0 with KOH. The precipitated KClO₄ was sedimented by centrifugation (40,000 g for 15 min), and supernatants were lyophilized. The lyophilized PA extracts of muscle tissue were redissolved in 0.6-0.8 mL deuterium oxide (D₂O) and centrifuged. Prior to analysis the pH was adjusted to 7.0 with deuterium chloride (DCl) and NaOD. ¹H- and ¹³C-NMR spectra were

recorded on Bruker DRX 600 or AMX 360/AM 360 spectrometers, operating at frequencies of 600 MHz or 360 MHz for ^1H -, and 150.9 MHz or 90.5 MHz for ^{13}C -measurements.

^1H -NMR spectra were recorded with a 5-mm H,C,N inverse triple resonance probe, 400 accumulations, repetition time 15 s, spectral width 7183 Hz (DRX 600) or 3623 Hz (AM/AMX 360), data size 16 K, zero filling to 32 K. Chemical shifts were referenced to lactate at 1.33 ppm.

^{13}C -NMR spectra were recorded with a 5-mm $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ dual probe, 10,000 accumulations, repetition time 2.5 s, composite pulse decoupling with WALTZ-16, spectral width 47,619 Hz (DRX 600) or 20,833 Hz (AM/AMX 360), data size 32 K (16 K), zero filling to 64 K (32 K). Chemical shifts were referenced to the C-3 signal of lactate at 21.3 ppm.

Glutamine concentrations ($\mu\text{mol/g}$ tissue) were determined from fully relaxed ^1H -NMR spectra of muscle extracts using (trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3, d_4 -acid as an external standard. Fractional enrichment in glutamine (C3 position) a measure of *de novo* glutamine synthesis was calculated from ^{13}C -NMR spectra as previously described (Zwingmann et al. 2003).

Statistical Analysis of Data.

Data were analyzed by unpaired *t* test. In cases where the variances between compared groups were significantly different, the unpaired *t* test was modified with Welch's correction. The data were considered to be significantly different at $p < 0.05$.

RESULTS

Effect of ALF on plasma ammonia and glutamine levels.

Plasma ammonia and glutamine levels in ALF rats are shown in Table 1. ALF resulted in a significant 16.1 fold ($p<0.001$) increase of arterial ammonia levels 6 h post-HAL compared to sham-operated control values. Arterial glutamine levels were concomitantly increased 6.4 fold ($p<0.001$) in the ALF animals.

Effect of ALF on GS gene expression, protein and activity in skeletal muscle and brain.

ALF resulted in a significant increase of GS protein in skeletal muscle (Figure 1A, 1B) and a small but significant loss of GS protein in brain (frontal cortex) 6 h post-HAL compared to sham-operated controls ($p<0.05$). GS mRNA was unchanged following ALF (data not shown).

Changes in GS enzyme activities paralleled those of GS protein: ALF resulted in a 38% increase ($p<0.05$) in GS enzyme activities in skeletal muscle 6 h post-HAL (Figure 1C). In contrast, a small but significant loss ($p<0.05$) of GS activity was observed in the cerebral cortex of ALF animals at the same time point.

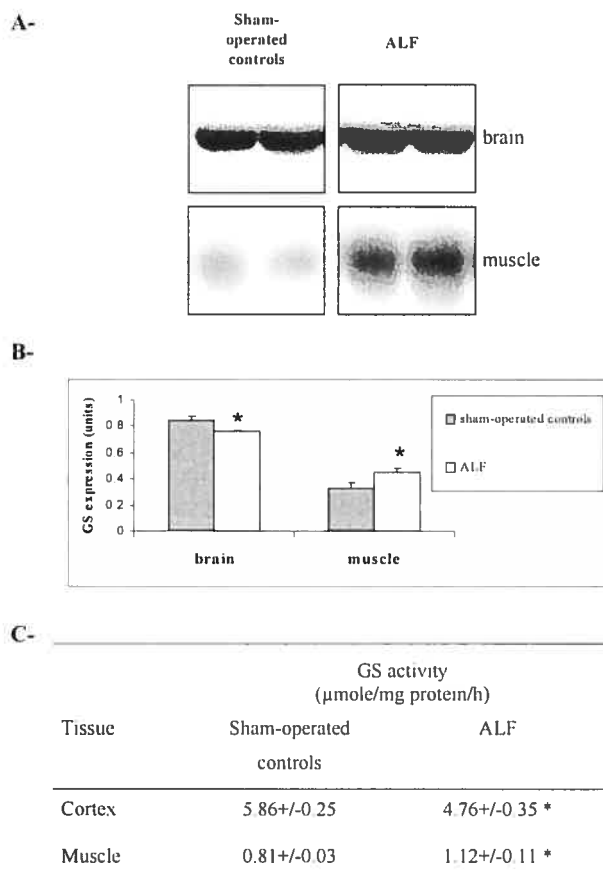


Figure 1: GS protein and enzyme activities in brain (cerebral cortex) and skeletal muscle of rats with ALF.

(A)- Representative Western blots of GS (45KDa) from two ALF rats compared to sham-operated controls. (B)- GS protein data from n=8 animals per treatment group. (C) GS enzyme activities determined in cerebral cortex and skeletal muscle of 8 ALF rats compared to 8 sham-operated controls. Values represent mean \pm SE, * indicates values significantly different from sham-operated control values ($p < 0.05$).

Arterio-venous differences across skeletal muscle of ALF rats.

Sham operated control rats manifested significantly lower ammonia concentrations in the femoral vein compared to the femoral artery leading to an A-V difference of $19.8 \pm 5.8 \mu\text{M}$. This A-V difference was increased 5-fold 6 h post-HAL in the HAL group ($103.9 \pm 14.2 \mu\text{M}$; $p < 0.001$) (Table 1).

Table 1: Arterial plasma levels, A-V differences, muscle ammonia and glutamine fluxes, and hemodynamics in the hindlimb of rats with acute liver failure compared to sham-operated controls.

	Sham-operated controls	ALF
Arterial levels (μM)		
Ammonia	33.0 ± 5.8	$533.1 \pm 35.7^{**}$
Glutamine	604 ± 33	$3870 \pm 220^{**}$
A-V differences (μM)		
Ammonia	19.8 ± 5.8	$103.9 \pm 14.2^{**}$
Glutamine	-84.5 ± 20.9	$-431.8 \pm 75.6^*$
Hemodynamics		
Mean percentage difference in blood flow between the left and right kidneys (%)	9.3 ± 2.4	11.8 ± 1.8
Muscle blood flow (mL/min/100 g of muscle)	9.3 ± 2.0	$26.8 \pm 2.5^{**}$
Muscle Fluxes ($\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$ of muscle)		
Ammonia	0.22 ± 0.12	$2.76 \pm 0.51^*$
Glutamine	-0.91 ± 0.33	$-12.18 \pm 2.22^{**}$

NOTE: Values represent mean \pm SEM of 8 rats per treatment group. Values significantly different from sham-operated group are indicated by: *, $p < 0.01$ and **, $p < 0.001$.

These positive A-V differences for ammonia across the hind limb of control animals were accompanied by a significant release of glutamine (A-V difference of $-84.5 \pm 20.9 \mu\text{M}$). This A-V difference for glutamine was significantly increased 5-fold 6 h post-HAL in the ALF group ($-431.8 \pm 75.6 \mu\text{M}$, $p < 0.01$) (Table 1).

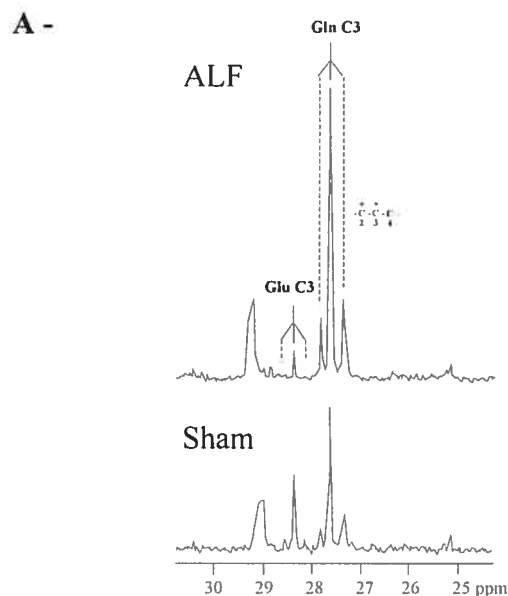
Effect of ALF on muscle blood flow and on fluxes of glutamine and ammonia across the hind limb.

Values for muscle blood flow are presented in the Table 1. Variation of renal blood flow between the right and left kidney were less than 20% and differences between the two treatment groups were not significant indicating that the procedure used was valid. There was a significant 188% ($p<0.01$) increase in muscle blood flow 6 h post-HAL compared to sham operated control values.

Uptake of ammonia across the hind limb was significantly increased in ALF rats compared to sham-operated controls ($2.76 \pm 0.51 \mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$ of muscle versus $0.22 \pm 0.11 \mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$; $p<0.01$) (Table 1). Glutamine release by the hind limb was concomitantly increased from $-0.91 \pm 0.33 \mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$ of tissue in control rats to $-12.18 \pm 2.22 \mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$ of tissue in ALF rats ($p<0.001$).

Effect of ALF on de novo glutamine synthesis in skeletal muscle.

$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR measurements revealed a significant 73.4 % ($p<0.0001$) increase in muscle glutamine levels 6 h post-HAL compared to sham-operated controls (Figure 2A, 2B). Increased muscle glutamine levels were accompanied by significant 63% ($p<0.01$) increase in ^{13}C glutamine labeling from $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ glucose indicating increased *de novo* glutamine synthesis (Figure 2B).



B -

	Control	ALF
Total Gln ($\mu\text{mol} / \text{g ww}$)	10.77 ± 1.75	18.67 ± 2.15 *
Gln ^{13}C -enrichment ($\mu\text{mol} / \text{g ww}$)	0.33 ± 0.05	0.54 ± 0.04 *

Figure 2: Muscle glutamine concentrations and *de novo* synthesis from [U- ^{13}C]-glucose, in rats with ALF compared to sham-operated controls measured by $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR.

(A) Representative ^{13}C -spectra of muscle extracts, Gln C3: glutamine labeled in position C3; Glu C3: glutamate labeled in position C3. The singlet in the C3 glutamine peak position represents the natural abundance of ^{13}C in unlabeled glutamine and monolabeled glutamine. The doublet (dashed lines) represents double-labeled [2,3- ^{13}C]-glutamine synthesized *de novo* from [U- ^{13}C]-glucose in the TCA cycle. (B) Muscle glutamine concentration and its *de novo* synthesis (^{13}C enrichment in C3 glutamine) from glucose in ALF rat muscle compared to sham-operated controls. Values represent mean \pm SE from 6 rats per treatment group. * Indicates values significantly different from sham-operated control $p < 0.0001$.

DISCUSSION

Results of the present study provide the first unequivocal evidence in support of the notion that skeletal muscle ammonia removal capacity is increased in ALF. This increase occurs as a consequence of an early post-transcriptional increase in

expression of glutamine synthetase (GS) a cytosolic enzyme (Figure 3) that is predominantly responsible for ammonia removal by skeletal muscle which is devoid of an effective urea cycle.



Figure 3: Schematic representation of the glutamine synthesis reaction in muscle and brain.

Glutamine synthetase activities were increased by 40% early during the progression of ALF and ^{13}C -Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic studies confirmed that this increase led to a significant increase in *de novo* synthesis of glutamine by skeletal muscle. These findings confirm and extend those of a previous study based upon a report of increased ammonia removal and glutamine release in the femoral vein in patients with ALF (Clemmesen et coll., 2000).

In the present study, induction of GS protein and enzyme activities led to a significant decrease in arterio-venous differences for glutamine. Muscle blood flow was concomitantly increased 2.7-fold consistent with the well-established hyperdynamic circulation characteristic of ALF. An accurate measurement of muscle ammonia and glutamine fluxes requires measurement of arterio-venous differences corrected for change in organ blood flow. Such a computation in the present study reveals a 12-fold uptake of ammonia and a corresponding increase of muscle

glutamine release from skeletal muscle. That these findings represented principally increased glutamine synthesis in skeletal muscle was confirmed by studies with ^{13}C NMR which showed unequivocally that *de novo* synthesis of glutamine was significantly increased. However, since glutamine *de novo* synthesis is only increased by 1.6 fold and glutamine release is increased 12 fold, synthesis of glutamine from other sources of carbon than glucose or muscle protein breakdown cannot be ruled out.

In contrast to skeletal muscle, results of the present study clearly demonstrate that, GS protein expression and enzyme activities in brain manifest small but statistically significant reductions 6h following hepatic devascularization. A possible explanation for these findings has recently emerged. Exposure of cultured rat astrocytes (the cells that express GS in the brain) to pathophysiologically relevant (low millimolar) concentrations of ammonia results in significant nitration of GS on the tyrosine residues (Schliess et coll., 2002) leading to a significant reduction of GS activity. Whether or not similar mechanisms are responsible for the loss of brain GS expression in ALF awaits the results of ongoing studies. These findings of a lack of induction of brain GS in ALF again underscores the brain's lack of an adequate protective mechanism against ammonia toxicity.

In conclusion, ALF resulting from hepatic devascularization in the rat results in an early increase in GS activity in skeletal muscle, an increase that results from post-transcriptional change in GS protein. Spectroscopic studies confirm that this increase in activity results in increased *de novo* synthesis of glutamine in the muscle and studies of arterio-venous differences corrected for muscle blood flow reveal significant increases of muscle glutamine release. Initial studies suggest that similar

mechanisms occur in ALF patients. If confirmed, these findings suggest that the maintenance of skeletal muscle mass and the use of agents with the potential to stimulate GS activity in skeletal muscle could be useful in the reduction of circulating ammonia and the prevention of the cerebral complications of ALF.

REFERENCES

Blei A.T., Omary A., and Butterworth R.F. (1992) Animal Models of Hepatic Encephalopathy, in *Animal Models of Neurological Diseases II, Neuromethods* (Boulton A.A., Baker G.B., and Butterworth R.F., eds.), pp. 183-222. Human Press, Totowa.

Chatauret N., Rose C., Therrien G., and Butterworth R. F. (2001) Mild hypothermia prevents cerebral edema and CSF lactate accumulation in acute liver failure. *Metab Brain Dis* **16**, 95-102.

Clemmesen J. O., Kondrup J., and Ott P. (2000) Splanchnic and leg exchange of amino acids and ammonia in acute liver failure. *Gastroenterology* **118**, 1131-1139.

Clemmesen J. O., Larsen F. S., Kondrup J., Hansen B. A., and Ott P. (1999) Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology* **29**, 648-653.

Desjardins P., Rao K. V., Michalak A., Rose C., and Butterworth R. F. (1999) Effect of portacaval anastomosis on glutamine synthetase protein and gene expression in brain, liver and skeletal muscle. *Metab Brain Dis* **14**, 273-280.

Dienst S. G. (1961) An ion exchange method for plasma ammonia concentration. *J Lab Clin Med* **58**, 149-155.

Ganda O. P. and Ruderman N. B. (1976) Muscle nitrogen metabolism in chronic hepatic insufficiency. *Metabolism* **25**, 427-435.

Girard G. and Butterworth R. F. (1992a) Effect of portacaval anastomosis on glutamine synthetase activities in liver, brain, and skeletal muscle. *Dig Dis Sci* **37**, 1121-1126.

Girard G. and Butterworth R. F. (1992b) Effect of portacaval anastomosis on glutamine synthetase activities in liver, brain, and skeletal muscle. *Dig Dis Sci* **37**, 1121-1126.

Heymann M. A., Payne B. D., Hoffman J. I., and Rudolph A. M. (1977a) Blood flow measurements with radionuclide-labeled particles. *Prog Cardiovasc Dis* **20**, 55-79.

Heymann M. A., Payne B. D., Hoffman J. I., and Rudolph A. M. (1977b) Blood flow measurements with radionuclide-labeled particles. *Prog Cardiovasc Dis* **20**, 55-79.

Lee S. H. and Fisher B. (1961) Portacaval shunt in the rat. *Surgery* **50**, 668-672.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.

Michalak A., Rose C., Butterworth J., and Butterworth R. F. (1996) Neuroactive amino acids and glutamate (NMDA) receptors in frontal cortex of rats with experimental acute liver failure. *Hepatology* **24**, 908-913.

Schliess F., Gorg B., Fischer R., Desjardins P., Bidmon H. J., Herrmann A., Butterworth R. F., Zilles K., and Haussinger D. (2002) Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *FASEB J* **16**, 739-741.

Szerb J. C. and Butterworth R. F. (1992) Effect of ammonium ions on synaptic transmission in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* **39**, 135-153.

Yang S., Chung C. S., Ayala A., Chaudry I. H., and Wang P. (2002) Differential alterations in cardiovascular responses during the progression of polymicrobial sepsis in the mouse. *Shock* **17**, 55-60.

Zwingmann C., Chatauret N., Leibfritz D., and Butterworth R. F. (2003) Selective increase of brain lactate synthesis in experimental acute liver failure: results of a [¹H-¹³C] nuclear magnetic resonance study. *Hepatology* **37**, 420-428.

CHAPITRE 3

DISCUSSION GÉNÉRALE

1. MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE CÉRÉBRAL LORS D'UNE INSUFFISANCE HÉPATIQUE AIGÜE

1.1. Élévation des niveaux de lactate cérébral lors d'une IHA

Les premières évidences d'une élévation des niveaux de lactate cérébral chez l'humain ayant une IHA, ont été rapportées par Yao et coll. (1987). Les auteurs ont mis en évidence une augmentation des concentrations de lactate dans le liquide céphalorachidien (LCR) de patients souffrant d'IHA. Plus tard, ces résultats ont été renforcés par la mise en évidence d'une production de lactate par le cerveau de patients souffrant d'IHA (Wendon et coll., 1994), ainsi que d'une élévation des concentrations de lactate extracellulaire dans des échantillons prélevés par microdialyse (Tofteng et coll., 2002; Tofteng et Larsen., 2002) chez des patients ayant la même pathologie. Dans les études de microdialyse, Tofteng et coll., en 2002 ont rapporté des niveaux 2 à 5 fois plus élevés de lactate extracellulaire dans le cerveau de patients ayant une hypertension intracrânienne.

Des élévations comparables des taux de lactate ont été rapportées dans le cerveau et le LCR d'un modèle expérimental d'IHA induite par une dévascularisation hépatique (articles, 1, 2 et 3 de cette thèse) ainsi que par d'autres groupes utilisant le même modèle (Bates et coll., 1989; De Graaf et coll., 1991) mais aussi dans des modèles d'IHA induite par une hépatectomie totale (Flock et coll., 1966; Tyce et coll., 1971) et par des toxines hépatiques (Bates et coll., 1989; Peeling et coll., 1993; Nyberg et coll., 1998)

Des études utilisant des injections d'ammoniaque (Hawkins et coll., 1973; Fitzpatrick et coll., 1989; Therrien et coll., 1991) et d'uréase (Cooper et Lai., 1987; Bosman et coll., 1990; De Graaf et coll., 1991) ont aussi rapporté des élévations des taux de lactate cérébral comparables à celles rapportées lors d'IHA chez l'humain ou induites expérimentalement. Ceci indique que l'ammoniaque serait directement impliqué dans les élévations des taux de lactate cérébral.

1.2. Origine des taux élevés de lactate cérébral lors d'une IHA

Les augmentations des taux de lactate cérébral rapportées dans les articles 1, 2 et 3 de cette thèse ainsi que lors d'une IHA chez l'humain peuvent avoir plusieurs origines. Elles peuvent être la conséquence: (1) d'une hypoxie; (2) d'une augmentation du transport du lactate plasmatique au travers de la barrière hémato-encéphalique (BHE); (3) d'une augmentation de la synthèse de lactate; (4) d'une augmentation de la consommation d'ATP.

1.2.1. Présence d'une hypoxie cérébrale (déficit en ATP) lors d'une IHA

D'une manière générale, une augmentation des concentrations de lactate est souvent interprétée comme étant la conséquence d'une hypoxie. En 1994, Wendon et coll. ont démontré que certains patients souffrant d'une IHA sévère, présentaient une augmentation de l'efflux de lactate cérébral peu de temps après avoir présenté des épisodes d'hypertension intracrânienne (Wendon et coll., 1994). De plus, les auteurs ont rapporté une augmentation concomitante du débit sanguin cérébral et du métabolisme cérébral lors d'une infusion d'acétylcystéine. La N-acétylcystéine est un antioxydant et un agent vasodilatateur. Il a été rapporté que son utilisation lors d'une

IHA augmentait l'utilisation d'oxygène dans la microcirculation (Ellis et Wendon., 1996). Ces observations indiquent qu'une hypoxie pourrait être un problème important dans les cas sévères d'IHA. Cependant, il faut noter que des lésions cérébrales de type hypoxique ne sont pas courantes chez les patients qui survivent à une IHA et à un œdème cérébral (Larsen et coll., 1997).

De plus, l'hypoxie induit souvent un déficit en ATP. Or, plusieurs études menées dans des modèles expérimentaux d'IHA (tableau 1), ainsi que dans des modèles d'hyperammoniémie, n'ont en majorité rapporté aucun changement dans les niveaux d'ATP cérébral.

Tableau 1: Niveau d'ATP cérébral dans différents modèles expérimentaux d'insuffisance hépatique aiguë.

Études	Niveaux d'ATP	Modèle	Animal	Région	Méthode
Mans et al. (1994)	→	Ischémie hépatique	Rat	Cerveau complet	Biochimique
Deutz et al. (1988)	→	Ischémie hépatique	Rat	Cortex cérébral	Spectroscopie de RMN
Funovics et Fischer (1978)	→	Ischémie hépatique	Rat	Cerveau complet	Biochimique
Holmin et al. (1983)	→	Hépatectomie totale	Rat	Cortex fronto-pariétal	?
Bates et al. (1988)	↓	CCl ₄ et paracétamol	Rat	Cortex cérébral	spectroscopie de RMN <i>in vivo</i> et biochimique

Seule une étude sur cinq, utilisant un modèle d'insuffisance hépatique (Bates et coll., 1988) et deux (Hindfelt et coll., 1977; Kosenko et coll., 1994) études sur huit, utilisant des injections d'ammoniaque ou d'uréase, ont rapporté une diminution des niveaux d'ATP cérébraux (Hawkins et coll., 1973; McCandless et Schenker., 1981; Lin et Raabe., 1985; Fitzpatrick et coll., 1989; Friolet et coll., 1989; Matsuoka et coll., 1990). Dans tous les cas, les différences de résultats peuvent s'expliquer soit par une méthode d'extraction sous-optimale qui peut conduire à une diminution artéfactuelle des niveaux d'ATP; soit par l'injection de doses d'ammoniaque qui sont le plus souvent létales et qui conduisent à des taux d'ammoniaque plasmatique et cérébral largement supérieurs à ceux observés lors de la pathologie.

En conclusion, on peut avancer que les augmentations des taux de lactate observées lors d'une IHA ne sont pas le reflet d'une hypoxie ou d'un déficit en ATP.

1.2.2. Augmentation du transport du lactate au travers de la barrière hémato-encéphalique lors d'une IHA

Une élévation des taux de lactate plasmatique est présente chez 80% des patients ayant une IHA (Bihari et coll., 1985). En général cette augmentation est attribuée à une diminution de l'élimination hépatique du lactate produit au niveau périphérique (Berry., 1967). Une étude faite chez des patients normaux, montre que 15 % du lactate plasmatique peut être capté par le cerveau humain (Knudsen et coll., 1991). On ne peut donc pas exclure le fait que l'élévation des taux cérébraux de lactate observée lors d'une IHA soit la conséquence d'une augmentation de sa capture suite à la présence de taux élevés de lactate dans le plasma.

Le lactate est transporté au travers des membranes cellulaires des mammifères par une famille de transporteurs des monocarboxylates (MCT) (Enerson et Drewes., 2003). MCT1 est responsable du transport du lactate au niveau de la BHE. Sa distribution est équivalente à celle du transporteur du glucose GLUT1 (Gerhart et coll., 1989), ce qui fait que MCT1 joue sûrement un rôle significatif dans le transport des monocarboxylates au travers de la BHE et de la barrière cerveau-LCR. MCT1 est un transporteur bidirectionnel. Cependant le taux d'efflux du lactate à l'état stable est estimé être 3 fois supérieur à celui de l'influx (Pardridge et coll., 1975).

Malgré plusieurs évidences suggérant que le cerveau soit capable de capter le lactate périphérique, il est peu probable que les élévations des taux de lactate cérébral lors d'une IHA, rapportées dans le paragraphe 1.2.1 de ce chapitre, soient la conséquence d'une augmentation des taux plasmatiques du métabolite puisque Alexander et coll. (1962) n'ont pu démontrer aucune augmentation significative des niveaux de lactate cérébral suite à son administration par voie intraveineuse. De plus, Posner et Plum (1967) ont rapporté une indépendance entre le lactate sanguin et le lactate du LCR dans une variété de troubles neurologiques (Posner et Plum., 1967). Il est donc très probable que les augmentations de lactate qui ont été observées dans le LCR lors d'une IHA, soient la conséquence de changements métaboliques cellulaires intrinsèques au cerveau.

De fait, des études cliniques du métabolisme énergétique cérébral lors d'une IHA ont mis en évidence une faible capture de lactate par le cerveau peu de temps après le développement des stades 3-4 de l'EH (Strauss et coll., 1999; Jalan et coll., 1999; Tofteng et Larsen., 2002), tandis qu'un efflux de lactate prévaut à un stade plus avancé, lorsqu'un œdème cérébral est présent (Wendon et coll., 1994). Ces

observations indiquent qu'il y aurait une production cérébrale de lactate lors des stades avancés de l'encéphalopathie. Cette hypothèse est renforcée par les travaux de Hawkins et al., en 1973, qui ont rapporté une libération de lactate par le cerveau lors d'une injection d'acétate d'ammonium.

En résumé, bien que la contribution exacte du lactate plasmatique à l'élévation des concentrations de lactate cérébral lors d'une IHA reste encore à examiner, des évidences suggèrent toutefois qu'il ne jouerait pas un rôle important. Ceci nous laisse donc supposer que l'augmentation des taux de lactate cérébral aurait pour cause une augmentation de sa synthèse au niveau du cerveau.

1.2.3. Augmentation de la synthèse intracérébrale de lactate lors d'une IHA

Une augmentation de la synthèse intracérébrale de lactate a été rapportée par les études 2 et 3 de cette thèse en utilisant la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) [^1H - ^{13}C] *ex vivo* après l'injection intrapéritonéale de [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-glucose dans un modèle animal d'IHA (Zwingmann et coll., 2003; Chatauret et coll., 2003). Cette technique permet de déterminer la synthèse *de novo* de différents métabolites du glucose, en particulier le lactate. Dans ces études, les auteurs ont mis en évidence une augmentation des niveaux de lactate cérébral accompagnée d'une augmentation sélective de 2.5 fois de sa synthèse *de novo* dans le cerveau total ou dans le cortex frontal de rats ayant une IHA.

Cette augmentation de synthèse dans le cerveau lors d'une IHA peut s'expliquer par une activation directe de la glycolyse mais aussi par une perturbation

de la navette malate-aspartate, par une perturbation du cycle de Krebs et par une augmentation de la consommation d'ATP.

1.2.3.1. Activation de la glycolyse lors d'une hyperammoniémie

L'augmentation de la synthèse cérébrale de lactate pourrait être la conséquence d'une activation de la glycolyse qui produirait des quantités de pyruvate supérieures à la capacité d'oxydation du cycle de Krebs. Le pyruvate excédentaire serait alors utilisé pour synthétiser du lactate.

Ainsi, il a été démontré que l'activité de la phosphofructokinase (enzyme limitante de la glycolyse, voir paragraphe 5.1 du chapitre 1) est modulée de façon positive par les ions ammonium (Lowry et Passoneau., 1966; Abrahams et Younathan., 1971). À la vue de ces résultats, on s'attend donc à avoir une élévation de l'activité glycolytique lors d'une hyperammoniémie due à une IHA. Cette hypothèse est supportée par les résultats de deux études menées par Murthy et al. qui ont rapporté de façon constante dans des modèles d'hyperammoniémie pure, des élévations des niveaux cérébraux des intermédiaires de la glycolyse qui s'accompagnaient d'une augmentation de l'activité de plusieurs enzymes de la glycolyse incluant la phosphofructokinase, l'aldolase, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et la pyruvate kinase (Ratnakumari et Murthy., 1992; Ratnakumari et Murthy., 1993). Cette augmentation de l'activité glycolytique va se traduire par une augmentation de la synthèse de pyruvate et de lactate par un effet d'action de masse (Wolfe et coll., 1991).

1.2.3.2. Inhibition de la navette malate-aspartate lors d'une hyperammoniémie

Au cours de la glycolyse (qui a lieu dans le cytoplasme) le glucose est converti en pyruvate. Cette oxydation nette entraîne la conversion du NAD^+ cytoplasmique en NADH. Pour que la glycolyse puisse fonctionner il faut que le NAD^+ soit régénéré. Cette régénération se fait soit par réduction du pyruvate en lactate (glycolyse anaérobie, qui a lieu dans le cytoplasme et qui produit du NAD^+ à partir du NADH), soit par oxydation du NADH dans la chaîne de transport d'électrons (dans la mitochondrie). La glycolyse anaérobie est, cependant, beaucoup moins favorable énergétiquement que l'oxydation complète du pyruvate dans le cycle de Krebs. Le NADH cytoplasmique ne peut pas traverser librement la membrane mitochondriale pour y être oxydé. La navette malate-aspartate a été proposée comme étant le mécanisme de transfert de ces équivalents réducteurs (Hindfelt et coll., 1977; Ratnakumari et Murthy., 1989). Elle est composée des formes cytosoliques et mitochondriales de la malate déshydrogénase et de l'aspartate aminotransférase ainsi que des échangeurs malate/ α -cétoglutarate et glutamate/aspartate. Les réactions impliquées dans le transfert d'équivalents réducteurs du cytoplasme vers la mitochondrie sont résumées dans la figure 1 de ce chapitre.

Des études d'hyperammoniémie *in vivo* ont rapporté une diminution de l'activité de la malate déshydrogénase et de l'aspartate aminotransférase (Ratnakumari et Murthy., 1989). Ceci nous laisse supposer qu'il y aurait une inhibition de la navette malate-aspartate lors d'une IHA.

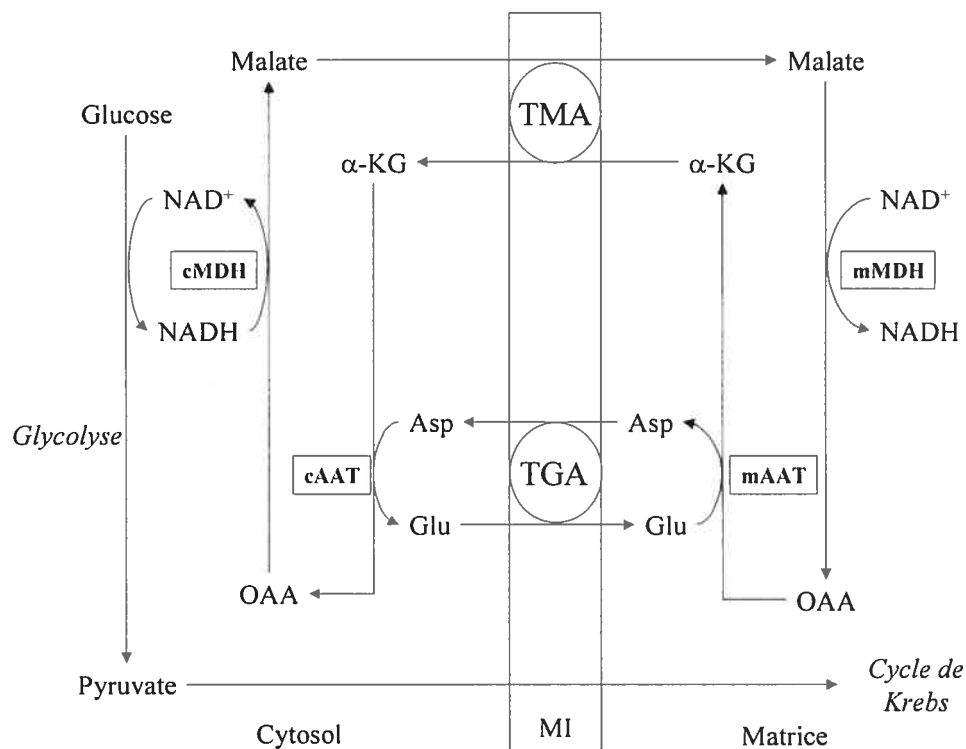


Figure 1 : Représentation schématique de la navette malate-aspartate.

Abréviations : α -KG : α -cétoglutarate; Asp :Aspartate; mAAT et cAAT : formes mitochondriales et cytosoliques de l'aspartate aminotransférase; mMDH et cMDH : formes mitochondriales et cytosoliques de la malate déshydrogénase; OAA : Oxaloacétate; TGA : Transporteur Glutamate-Aspartate; TMA : Transporteur Malate- α -cétoglutarate

La mise en évidence dans les articles 2 et 3 d'une diminution des niveaux de glutamate et d'aspartate lors d'une IHA (voir paragraphe 2.3 et 2.4 de ce chapitre) supporte aussi la présence d'une inhibition de la navette malate-aspartate lors d'une IHA puisque le fonctionnement de l'échangeur glutamate-aspartate est indispensable au fonctionnement de la navette. Une diminution de la disponibilité du glutamate et de l'aspartate conduira donc à une inhibition de la navette malate-aspartate.

Cette inhibition de la navette malate-aspartate aura pour conséquence de stimuler la synthèse de lactate à partir du glucose, afin de maintenir les niveaux d'équivalents réducteurs dans le cytosol.

1.2.3.3. Perturbations du cycle de Krebs lors d'une hyperammoniémie

Il est bien établi qu'une IHA ou une hyperammoniémie pure sont associées à une diminution de la consommation cérébrale d'oxygène (Alman et coll., 1956; Mckhann et Tower., 1961), ce qui indique que l'hyperammoniémie diminuerait l'oxydation du glucose.

Une inhibition du cycle de Krebs lors d'une IHA a été suggérée par les résultats d'expériences *in vitro* réalisées sur des mitochondries non-synaptiques. Lorsque ces préparations sont exposées à des concentrations physiopathologiques (2mM) d'ammoniaque, il y a une inhibition de l'activité de deux enzymes clés du cycle de Krebs, soit l' α -cétoglutarate déshydrogénase (KGDH) (Lai et Cooper., 1986; Lai et Cooper., 1991; Faff-Michalak et Albrecht., 1993) et l'isocitrate déshydrogénase (Katunuma et coll., 1966). Ces résultats *in vitro* ont été confirmés par Faff-Michalak et coll. qui ont mis en évidence une inhibition par 3mM de chlorure d'ammonium de l'activité d'une des enzymes du complexe KGDH, l' α -cétoglutarate décarboxylase (E1) dans les mitochondries non synaptiques sélectivement (Faff-Michalak et Albrecht., 1993).

En revanche, les auteurs ont démontré, lors de la même étude, qu'une IHA induite par la thioacétamide affectait principalement les mitochondries synaptiques. Ils ont rapporté une élévation de la V_{max} et du K_m de E1, qui suggère que *in vivo*, l'IHA et l'hyperammoniémie qui s'en suit, activerait le complexe KGDH. On trouve en faveur d'une activation du complexe KGDH, deux études réalisées dans des cerveaux de rats injectés avec de l'acétate d'ammonium (Ratnakumari et Murthy.,

1989) ou de la méthionine sulfoximine (Ratnakumari et coll., 1985) qui ont rapporté une élévation de l'activité KGDH.

De telles différences entre les résultats des études d'hyperammoniémie *in vitro* et *in vivo* peuvent résider dans le fait que les études *in vitro* impliquent l'addition directe d'ammoniaque à des mitochondries isolées, tandis que les études *in vivo* ont examiné les mitochondries après qu'elles aient été exposées à de l'ammoniaque *in vivo*. Dans ce cas des réactions non-mitochondriales associées avec l'ammoniaque pourraient avoir influencé les résultats.

À la vue de ces résultats, on ne peut pas conclure de façon affirmative qu'il y ait une inhibition ou une activation de la KGDH cérébrale lors d'une IHA. Cependant, la mise en évidence, dans les articles 2 et 3 de cette thèse, d'une diminution de la synthèse *de novo* de glutamate via la voie de la pyruvate déshydrogénase suggère qu'il y aurait une inhibition de l'oxydation du glucose lors d'une IHA (Zwingmann et coll., 2003; Chatauret et coll., 2003). Ceci supporte l'hypothèse d'une inhibition de l'activité de la KGDH *in vivo* lors d'une IHA.

L'inhibition de la KGDH et, par conséquent, du cycle de Krebs va entraîner une diminution de l'utilisation du pyruvate et donc de la production d'ATP. L'activité de la glycolyse anaérobie va alors être augmentée afin de maintenir les niveaux d'équivalents réducteurs et d'ATP. Le fait qu'une diminution des niveaux d'ATP ne soit pas évidente lors d'une IHA (voir paragraphe 1.2.1 de ce chapitre) peut signifier que la production d'ATP via la synthèse de lactate suffirait à rencontrer la demande énergétique du cerveau. Cette affirmation est supportée par la présence d'un coma lors d'une IHA et que lors d'un coma, le métabolisme cérébral est réduit de façon drastique (Laureys et coll., 2004).

1.2.3.4. Maintien des niveaux d'ATP lors d'une IHA

Dans des conditions physiologiques, l'ATP est surtout utilisé pour maintenir les potentiels de membrane, qui sont le résultat de gradients de concentrations d'ions de part et d'autre des membranes cellulaires. La Na^+ , K^+ -ATPase est responsable du maintien du gradient de sodium qui est important pour la capture de neurotransmetteurs par les terminaisons nerveuses et la glie (Tissari et coll., 1969). La Na^+ , K^+ -ATPase est une protéine ubiquitaire et on la retrouve dans le système nerveux central des mammifères surtout au niveau de la glie et des terminaisons nerveuses (Grisar et coll., 1979). On estime que jusqu'à 50% du métabolisme oxydatif dans le cerveau est dédié au maintien de l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase (Astrup et coll., 1981).

Les ions ammoniums (NH_4^+) peuvent affecter directement le potentiel membranaire des cellules nerveuses en altérant les transferts d'ions. Ces effets du NH_4^+ sont attribuables à ses propriétés ioniques apparentées à celles de l'ion K^+ (Cooper et Plum., 1987).

Une hypothèse pour expliquer l'augmentation de la synthèse de lactate dans le cerveau lors d'une IHA implique la sur-activation de la Na^+ , K^+ -ATPase. Celle-ci entraînerait une sur-consommation d'ATP qui aurait pour conséquence de stimuler la synthèse de lactate afin de maintenir les niveaux d'énergie. Des augmentations de l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase ont été rapportées dans un modèle d'IHA induite par la thioacétamide (Albrecht et coll., 1985) et dans un modèle d'hyperammoniémie pure (Kosenko et coll., 1994). Ces augmentations d'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase peuvent

s'expliquer par (1) une sur-activation des récepteurs glutamatergiques (2) par une activation de la capture du glutamate extracellulaire:

(1) Dans le cas du modèle d'hyperammoniémie pure, Kosenko et al., en 1994, ont injecté des doses létales d'acétate d'ammonium à des rats normaux. Les auteurs ont pu mettre en évidence que l'activation de la Na^+ , K^+ -ATPase était dépendante des récepteurs glutamatergiques de type N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA). L'activation de ces récepteurs conduit à une entrée massive d'ions Ca^{2+} mais aussi, à un moindre niveau, d'ions Na^+ . Les auteurs ont donc proposé que l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase était augmentée afin de maintenir l'homéostasie du Na^+ qui entre dans la cellule en même temps que le Ca^{2+} lors de l'activation des récepteurs au glutamate de type NMDA. Il est bien connu que les concentrations de glutamate extracellulaire sont augmentées lors d'IHA humaines (Tofteng et coll., 2002), et expérimentales (pour revue voir (Rose., 2002) (voir aussi paragraphe 3.3.2 de ce chapitre). Il est donc probable que lors d'une IHA, le glutamate extracellulaire sur-active les récepteurs NMDA, ce qui va conduire à une entrée d'ions Na^+ dans la cellule. En retour le Na^+ va stimuler l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase ce qui va augmenter la consommation d'ATP. Cette sur-consommation d'ATP perturberait le métabolisme oxydatif et conduirait à une activation de la glycolyse anaérobie qui fournirait de l'ATP plus rapidement que le cycle de Krebs.

(2) L'hypothèse selon laquelle le glutamate extracellulaire serait responsable de l'activation de la synthèse de lactate est renforcée par les travaux de Pellerin et Magistretti (1996), qui ont montré que les acides aminés excitateurs stimulent la glycolyse anaérobie dans des astrocytes en culture via une activation de la Na^+ , K^+ -ATPase (Pellerin et Magistretti., 1996). Contrairement à Kosenko et coll. (1994), les

auteurs ont proposé que l'activation de la Na^+ , K^+ -ATPase était causée par l'augmentation des concentrations de Na^+ due à son co-transport avec le glutamate dans les astrocytes. Or dans le cas d'une IHA, on attribue l'augmentation des taux de glutamate extracellulaire à une diminution de sa capture par les astrocytes (Butterworth., 2002). On peut donc avancer que lors d'une IHA, la sur-activation des récepteur NMDA plutôt que l'augmentation du co-transport de glutamate dans les astrocyte est à l'origine de la stimulation de l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase.

Une élévation de la consommation d'ATP causée par une augmentation de l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase, suite à une sur-activation des récepteurs NMDA, lors d'une IHA est donc probable. Cependant il faut noter que malgré les évidences d'une activation de la Na^+ , K^+ -ATPase présentées ci-dessus, ces résultats n'ont jamais été confirmés chez l'humain. Une étude menée par Seda et coll., (1984) a plutôt rapporté une inhibition de l'activité *in vitro* de la Na^+ , K^+ -ATPase de cerveau de rat lorsque les préparations étaient exposées à des sérums de patients ayant une IHA. Ceci indique qu'il y aurait une inhibition de l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase par des facteurs sériques chez l'humain lors d'une IHA (Seda et coll., 1984). De plus, une étude réalisée par le même groupe a rapporté une diminution de l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase dans le cerveau de rat ayant une IHA induite par la galactosamine (Ede et coll., 1987).

Ces divergences de résultats pourraient être le reflet des différents modèles et méthodes utilisés. Il faut noter que lorsque l'on utilise un modèle d'hyperammoniémie pure, il n'y a pas de facteurs libérés par le foie endommagé et que donc leurs effets ne sont pas présents. Il est probable que lors d'une IHA certains de ces facteurs circulants puissent affecter l'activation de la Na^+ , K^+ -ATPase au niveau du cerveau.

En conclusion, la compréhension des facteurs et des événements conduisant à une élévation des taux de lactate dans le cerveau lors d'une IHA expérimentale et humaine est encore incomplète. Les résultats des articles 2 et 3 suggèrent qu'une augmentation de sa synthèse prédomine pour expliquer ce phénomène mais il est encore impossible de cibler quels facteurs sont à l'origine de cette augmentation. Il est très probable que les hypothèses mentionnées précédemment dans le paragraphe 1.2.3 participent ensemble à l'augmentation des taux de lactate dans le cerveau lors d'une IHA.

2. SYNTHÈSE DES ACIDES AMINÉS LORS D'UNE INSUFFISANCE HÉPATIQUE AIGUË

Au niveau du cerveau, le glucose est aussi utilisé pour synthétiser des acides aminés. Certains sont impliqués dans la neurotransmission (glutamate et GABA) et d'autres dans la détoxification de l'ammoniaque (glutamine et alanine).

2.1. Effet sur la synthèse de l'alanine

Tout comme dans le cas du lactate, les niveaux d'alanine sont élevés dans le cerveau lors d'une IHA expérimentale induite par une dévascularisation hépatique (Swain et coll., 1992a; Mans et coll., 1994; Zwingmann et coll., 2003; Chatauret et coll., 2003).

L'alanine est un acide aminé dont le métabolisme a plusieurs points communs avec celui du lactate. Les hypothèses pour expliquer les augmentations de ses niveaux dans le cerveau sont donc en partie identiques à celles mentionnées dans le cas du

lactate. On citera entre autre, une augmentation du transport au travers de la BHE, une augmentation de sa synthèse, une perturbation du cycle de Krebs et de la régénération du NADH.

2.1.1. Augmentation du transport de l'alanine au travers de la BHE

Les niveaux plasmatiques d'alanine sont élevés lors d'une IHA expérimentale (Mans et coll., 1994; Zwingmann et coll., 2003). Cependant une augmentation du transfert de l'alanine du sang vers le cerveau est peu probable vu qu'au niveau de la BHE, la capture de ce petit acide aminé neutre est minime voire insignifiante (Swain et coll., 1992a).

2.1.2. Augmentation de la synthèse intracérébrale d'alanine

En faveur de l'augmentation de la synthèse d'alanine, les études menées dans les articles 2 et 3 de cette thèse ont rapporté une augmentation de la synthèse *de novo* d'alanine dans le cerveau et dans le cortex frontal respectivement (Zwingmann et coll., 2003; Chatauret et coll., 2003). Tout comme pour le lactate, cette augmentation de la synthèse peut être la conséquence : (1) d'une stimulation de la glycolyse; (2) d'une inhibition du cycle de Krebs; (3) d'une inhibition de la navette malate-aspartate (voir paragraphes 1.2.3 de ce chapitre). Les points (1) et (2) vont conduire à une accumulation du pyruvate. Le point (3) implique une augmentation de la synthèse d'alanine afin de maintenir les niveaux d'équivalents réducteurs. En effet, comme lors de la formation du lactate, la synthèse d'alanine via l'ALAT peut soutenir l'activité glycolytique en permettant la régénération du NAD⁺ via la réamination par la GDH de l' α -cétoglutarate qui a été formé lors de la transamination du pyruvate

avec le glutamate. On notera aussi que dans la rétine de l'abeille commune, où aucune activité de lactate déshydrogénase n'est présente, la synthèse d'alanine fixe l'ammoniaque à un taux excédant celui de la formation de glutamine (Tsacopoulos et coll., 1997). Ceci suggère que l'ALAT et la GDH pourraient opérer de façon complémentaire pour oxyder le NADH et fixer l'ammoniaque.

Aussi, les observations, lors d'une IHA, d'une augmentation de la synthèse *de novo* d'alanine rapportées dans les articles 2 et 3 ne supportent pas la présence d'une inhibition de l'activité de l'ALAT qui a été décrite par (Ratnakumari et Murthy., 1989), qui ont utilisé un modèle d'hyperammoniémie pure. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que ces études ont été réalisées *ex vivo* et que les études de cette thèse ont été faites *in vivo*.

En conclusion, on peut dire que l'augmentation des taux cérébraux d'alanine semble être la conséquence d'une augmentation de sa synthèse lors d'une IHA induite par une dévascularisation hépatique. On peut aussi assumer que l'IHA *in vivo* induite par une dévascularisation hépatique n'est pas caractérisée par une inhibition de l'activité de l'ALAT.

2.2. Effet sur la synthèse de la glutamine

Dans des conditions physiologiques, la synthèse de glutamine dans les astrocytes joue un rôle important dans la régulation de la neurotransmission glutamatergique. La synthèse de glutamine au niveau du système nerveux central participe non seulement au cycle glutamate-glutamine (voir paragraphe 4.2.1 du chapitre 1), mais c'est aussi le mécanisme principal d'élimination de l'ammoniaque au

niveau du cerveau lors d'une hyperammoniémie (Sibson et coll., 1997) (voir paragraphe 3.3.3 du chapitre 1). Cette synthèse se fait uniquement au niveau des astrocytes. Ainsi, dans le cas d'une IHA et de l'hyperammoniémie qui s'en suit, on s'attend à observer des niveaux élevés de glutamine dans le cerveau. De fait, des élévations de deux à quatre fois des niveaux de glutamine ont été rapportées dans le cerveau de patients décédés à la suite d'une IHA (Record et coll., 1976) et dans le cerveau de 5 patients pédiatriques en utilisant la spectroscopie de RMN (McConnell et coll., 1995). Ces résultats ont été renforcés par l'observation constante d'une élévation des concentrations cérébrales de glutamine dans différents modèles expérimentaux d'IHA (Holmin et coll., 1983; Bates et coll., 1989; Bosman et coll., 1992; Swain et coll., 1992a; Peeling et coll., 1993; Mans et coll., 1994; Michalak et coll., 1996; Albrecht et Dolinska., 2001).

2.2.1. Augmentation du transport de la glutamine au travers de la BHE

Il est peu probable que les élévations des taux de glutamine cérébrale soient la conséquence d'une augmentation des taux plasmatiques de cette dernière puisque des évidences indiquent que la glutamine ne pénètre pas la BHE (Lee et coll., 1998).

2.2.2. Augmentation de la synthèse intracérébrale de glutamine

Puisque la glutamine ne traverse pas la BHE, l'augmentation de ses taux dans le cerveau lors d'une IHA serait plus sûrement la conséquence d'une augmentation de sa synthèse *in situ*. Cette hypothèse est supportée par les résultats des articles 2 et 3 de cette thèse qui ont rapporté que l'augmentation des niveaux de glutamine cérébrale

était la conséquence d'une augmentation de sa synthèse *de novo* à partir du glucose et que cette augmentation de synthèse se faisait à la fois par la voie de la PDH et par la voie de la PC.

Une augmentation de la synthèse de la glutamine par les voies de la PDH et de la PC peut être la conséquence d'une augmentation de la détoxification de l'ammoniaque mais aussi la conséquence de changements du cycle glutamate-glutamine induits par l'ammoniaque. Ces changements conduiraient à une accumulation de glutamine soit par une diminution de l'utilisation de la glutamine, soit par une augmentation du cycle.

2.2.2.1. Détoxification de l'ammoniaque

Il existe plusieurs évidences indiquant que la glutamine synthétisée par la voie de synthèse anaplérotique (voie de la PC dans les astrocytes) est couplée directement à la détoxification de l'ammoniaque (Sibson et coll., 2001). Compte tenu de cette observation, on peut donc supposer que les élévations de la synthèse *de novo* de glutamine via la voie anaplérotique rapportées dans les articles 2 et 3 de cette thèse, sont représentatives de l'élimination de l'ammoniaque plutôt que la conséquence d'une interruption du cycle glutamate-glutamine.

En revanche, des augmentations concomitantes de la synthèse de glutamine par la voie oxydative ont aussi été observées dans le cerveau des animaux ayant une IHA dans les articles 2 et 3 de cette thèse. Ces augmentations de la synthèse de la glutamine par la voie de la PDH peuvent aussi représenter une augmentation de la détoxification de l'ammoniaque mais contrairement à la synthèse de glutamine par la

voie de la PC, il n'existe aucune évidence indiquant que la synthèse de glutamine par la voie de la PDH est directement couplée à l'élimination de l'ammoniaque.

2.2.2.2. Augmentation de la transformation du glutamate en glutamine

Une élévation des taux de glutamine marquée par les voies de la PC et de la PDH peut aussi être la conséquence d'une augmentation de l'échange de glutamate entre les neurones et les astrocytes, c'est-à-dire une augmentation du cycle glutamate-glutamine. Cette hypothèse est peu probable puisqu'il a été démontré que l'ammoniaque induisait une diminution de l'expression d'un des transporteurs astrocytaires du glutamate EAAT-2 (Knecht et coll., 1997) et une diminution de l'activité de EAAT-1 *in vitro* (Chan et coll., 2000), qui indiquent que le transport du glutamate dans les astrocytes est réduit. Cette réduction implique donc que les augmentations des taux de glutamine ne proviennent pas d'une augmentation du cycle glutamate-glutamine.

2.2.2.3. Inhibition de la transformation de la glutamine en glutamate

Dans les articles 2 et 3 de cette thèse on observe une diminution et une augmentation respective de la synthèse *de novo* du glutamate et de la glutamine par la voie de la PDH. Une inhibition de la transformation de la glutamine en glutamate, par la glutaminase dans les neurones, expliquerait la présence de ces deux phénomènes dans la même pathologie. En faveur de cette hypothèse, des études ont mis en évidence que l'activité de la glutaminase était inhibée par l'ammoniaque (Rao et Murthy., 1992; Wallace et Dawson, Jr., 1992). Une inhibition de la glutaminase entraînerait une accumulation de glutamine et une diminution des niveaux de

glutamate intracellulaire qui sont constamment observées lors d'une IHA (Bosman et coll., 1990; Mans et coll., 1994; Zwingmann et coll., 2003; Chatauret et coll., 2003).

2.2.2.4. Adaptabilité de la synthèse cérébrale de glutamine lors de l'IHA

L'article 2 de cette thèse rapporte qu'il n'y a pas d'augmentation supplémentaire de la biosynthèse de glutamine au stade du coma en comparaison avec le stade du précoma de l'encéphalopathie. Ces résultats viennent s'ajouter à ceux de Kanamori et al., (1996) qui, en utilisant la spectroscopie de résonance magnétique de ^1H *in vivo* dans un modèle hyperammonémique, ont mis en évidence l'absence d'une corrélation directe entre le stade de l'EH et l'activité de la glutamine synthétase. Ces résultats suggèrent que la capacité du cerveau à détoxifier l'ammoniaque en synthétisant de la glutamine est limitée lors d'une IHA. Des études antérieures supportent aussi cette affirmation. Par exemple, Cooper et Lai, (1987) ont montré que le cerveau de rats rendus hyperammonémiques d'une façon aiguë, ne s'adapte pas à une hyperammonémie prolongée en augmentant l'activité de la glutamine synthétase. Aussi, une limitation de la capacité de la glutamine synthétase a été conclue par Deutz et al., (1988) qui ont démontré la présence d'une augmentation plus rapide des niveaux cérébraux d'ammoniaque en comparaison avec ceux de la glutamine et par Bosman et al., (1992) qui ont observé, après une augmentation initiale des taux de glutamine extracellulaire lors d'une EH modérée, une diminution de ses taux lors d'une EH sévère. Enfin, les résultats de l'article 4, qui a utilisé le même modèle expérimental que celui utilisé pour l'article 2, rapportent même une diminution significative de l'expression et de l'activité de la glutamine synthétase dans le cerveau de rat ayant une IHA en comparaison avec des rats contrôles, et ce malgré la présence

de concentrations circulantes d'ammoniaque élevées (voir paragraphe 4.2 de ce chapitre).

En conclusion, on peut dire que lors d'une IHA, la synthèse de glutamine est élevée en réponse à l'hyperammoniémie. Cette élévation de synthèse est représentative d'une détoxification de l'ammoniaque et aussi possiblement d'une inhibition du cycle glutamate-glutamine. Il semble donc que le cerveau élimine l'ammoniaque en augmentant initialement la synthèse *de novo* de glutamine, cependant cette augmentation de la synthèse *de novo* ne s'accompagne pas d'une induction de la capacité synthétique de la GS. Cette absence d'adaptabilité de la GS cérébrale fait que son activité est vite surpassée par l'élévation des taux cérébraux d'ammoniaque si bien que les taux cérébraux de glutamine ne sont corrélés ni avec les taux d'ammoniaque dans le cerveau ni avec la sévérité de l'encéphalopathie.

2.3. Effet sur la synthèse du glutamate

Les résultats de plusieurs études ont suggéré que des altérations du système glutamatergique seraient impliquées dans la pathogenèse de l'encéphalopathie hépatique.

Une diminution des concentrations cérébrales de glutamate a été rapportée invariablement à la fois dans l'IHA expérimentale (Voorhies et coll., 1983; Bosman et coll., 1990; Swain et coll., 1992a; Mans et coll., 1994; Zwingmann et coll., 2003; Chatauret et coll., 2003) et humaine (Record et coll., 1976). Ces observations indiquent qu'il y aurait une inhibition de la synthèse de glutamate lors de l'IHA.

Les articles 2 et 3 de cette thèse, utilisant la spectroscopie par RMN de [^1H - ^{13}C] ont montré, par analyse des isotopomères du ^{13}C , que les diminutions des concentrations totales de glutamate dans le cerveau s'accompagnaient d'une réduction de la synthèse du [4- ^{13}C]-glutamate, (qui implique un flux de carbone via la voie de la PDH) tandis que la synthèse du [2- ^{13}C]-glutamate (via la PC dans les astrocytes) était inchangée (Zwingmann et coll., 2003; Chatauret et coll., 2003). Une diminution de la synthèse de glutamate par la voie oxydative est en accord avec une inhibition du métabolisme oxydatif cérébral lors d'une IHA. Cette observation appuie les évidences de Cooper et Lai (1986) démontrant que l'ammoniaque inhibe l'activité de la KGDH et que donc il inhiberait le cycle de Krebs. Ensemble, ces résultats suggèrent que la diminution des concentrations intracellulaires de glutamate que l'on observe chez l'humain ainsi que dans l'IHA expérimentale est le résultat d'une perturbation du métabolisme oxydatif qui conduit à une diminution de la synthèse *de novo* de glutamate à partir du glucose.

Le glutamate n'est pas seulement un puissant neurotransmetteur exciteur, il est aussi impliqué dans le métabolisme énergétique cérébral en participant à la navette malate-aspartate. Une réduction de la disponibilité du glutamate dans les neurones ou les astrocytes pourrait compromettre le métabolisme énergétique mitochondrial (voir paragraphe 1.2.3.2 de ce chapitre).

En conclusion, l'IHA conduit à une diminution des niveaux de glutamate intracellulaire en réduisant la synthèse *de novo* de glutamate via une inhibition du métabolisme oxydatif. Cependant, malgré ces baisses des niveaux intracellulaires de

glutamate, les niveaux de glutamate extracellulaires sont élevés lors d'une IHA (Rose., 2002).

2.4. Effet sur la synthèse du NAA

Une inhibition du métabolisme oxydatif neuronal est supportée par l'observation des effets de l'IHA sur les niveaux de N-acétylaspartate (NAA). Le NAA est un dérivé de l'aspartate qui est présent à haute concentration dans le cerveau. C'est un marqueur neuronal qui est synthétisé dans les mitochondries neuronales et qui est associé au métabolisme énergétique cérébral (Clark., 1998).

Les mesures de concentrations d'aspartate et de NAA par ¹H-RMN dans l'article 3 ont rapporté une diminution des taux des deux composés dans le cortex frontal de rats au stade de coma de l'encéphalopathie dans des conditions normothermiques.

Une diminution des concentrations cérébrales de NAA est en accord avec un dysfonctionnement mitochondrial dans les neurones et appuie l'hypothèse qui suggère que l'hyperammoniémie affecte le métabolisme énergétique neuronal.

2.5. Effet sur la synthèse du GABA

Contrairement au glutamate et à la glutamine, aucune altération significative de la synthèse *de novo* et des niveaux de GABA dans le cerveau n'a été observée aux différents stades de l'encéphalopathie (Article 2 et Article 3). Ces résultats viennent renforcer les données de plusieurs études antérieures qui ont rapporté que les concentrations de GABA restaient inchangées dans le cerveau entier (Holmin et coll.,

1983; Swain et coll., 1992a; Mans et coll., 1994), dans le liquide céphalorachidien (Swain et coll., 1992b) ainsi que dans des microdialysats (Michalak et coll., 1996) lors d'IHA expérimentales. Une absence d'altérations du GABA cérébral a été rapportée dans le liquide céphalorachidien de patients cirrhotiques avec ou sans encéphalopathie (Moroni et coll., 1987) et par autopsie dans le cerveau de patients décédés à la suite d'une IHA (Record et coll., 1976).

Ces données supportent l'hypothèse selon laquelle l'inhibition neurale observée à la fois lors d'une IHA humaine et expérimentale (Record et coll., 1976; Voorhies et coll., 1983; Mans et coll., 1994; Zwingmann et coll., 2003) n'est pas la conséquence d'une augmentation de la synthèse du GABA dans le cerveau. Aussi, l'absence d'altérations des niveaux du GABA suggère que la baisse des niveaux de glutamate intracellulaire (précurseur du GABA) n'est pas localisée dans le compartiment GABAergique.

3. CONSÉQUENCES CÉRÉBRALES DES ALTÉRATIONS DU MÉTABOLISME DU GLUCOSE LORS D'UNE IHA ET EFFET DE L'HYPOTHERMIE.

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 6.0 du chapitre 1, les deux principaux facteurs que l'on pense être impliqués dans l'étiologie de l'œdème cérébral sont une perturbation osmotique et une augmentation du débit sanguin cérébral qui vont tous deux conduire à une entrée d'eau dans le cerveau.

Il est bien connu que l'hypothermie prévient l'apparition de l'œdème cérébral dans l'IHA expérimentale (Traber et coll., 1989; Rose et coll., 2000; Chatauret et

coll., 2001) et humaine (Jalan et coll., 1999). Dans cette thèse, nous avons utilisé l'hypothermie comme outil afin de discerner quels étaient les changements métaboliques observés au stade de coma de l'EH qui étaient liés à la présence d'œdème cérébral.

3.1. Perturbations osmotiques lors d'une IHA.

3.1.1. Rôle joué par l'accumulation intracellulaire de la glutamine

Dans le passé, il a été suggéré que l'œdème cérébral observé dans les syndromes hyperammonémiques tels que l'IHA, était la conséquence d'une élévation de l'osmolarité due à une accumulation intracellulaire de glutamine dans les astrocytes suite à l'augmentation des niveaux d'ammoniaque dans le cerveau (Cordoba et Blei., 1996). En faveur de cette hypothèse, on trouve les rapports de plusieurs études qui ont démontré une augmentation de la pression intracrânienne (PIC) chez des primates infusés avec de l'ammoniaque (Voorhies et coll., 1983) et une augmentation des concentrations cérébrales de glutamine lors d'une IHA aussi bien chez l'humain (Record et coll., 1976) que dans des modèles expérimentaux (Bosman et coll., 1990; Swain et coll., 1992a). De plus, l'inhibition de la synthèse de glutamine par la méthionine sulfoximine (MSO), prévient partiellement l'apparition de l'œdème cérébral induit par des infusions d'ammoniaque (Takahashi et coll., 1991; Cordoba et Blei., 1996). Ces observations renforcent l'implication de la glutamine dans l'étiologie de l'œdème cérébral.

Cependant, il est risqué de conclure que l'effet protecteur de la MSO sur le développement de l'œdème cérébral lors d'une IHA passe par une réduction de l'accumulation de glutamine puisque la MSO a des effets multiples en plus d'inhiber la synthèse de glutamine. Par exemple, la MSO induit aussi un efflux massif de glutamine par les astrocytes en culture (Albrecht et Norenberg., 1990). L'effet protecteur de la MSO pourrait être indépendant de son effet sur les niveaux de glutamine. Plusieurs évidences supportent l'hypothèse selon laquelle l'accumulation de glutamine ne serait pas directement impliquée dans le développement de l'œdème cérébral. De fait, une accumulation de glutamine dans le cerveau est aussi observée lors d'une insuffisance hépatique chronique, une condition qui n'est normalement pas associée à un œdème cérébral et à ses conséquences (Cordoba et Blei., 1996; Albrecht et Dolinska., 2001). Ainsi, malgré l'existence de plusieurs données expérimentales supportant la glutamine comme étant un osmolyte impliqué dans l'étiologie de l'œdème cérébral, on ne peut pas conclure de façon certaine que l'accumulation de glutamine dans le cerveau soit la cause principale du développement de l'œdème cérébral lors d'une IHA (Albrecht et Dolinska., 2001).

Les résultats présentés dans l'article 2 de cette thèse, rapportent que les concentrations cérébrales de glutamine ne sont pas significativement plus élevées au stade de coma de l'encéphalopathie en comparaison au stade de précoma, et ce malgré que la teneur en eau du cerveau soit plus élevée au stade du coma par rapport au précoma. Le fait que les taux de glutamine soient aussi élevés au stade du précoma (qui n'est pas associé avec un œdème cérébral) qu'au stade du coma (où l'œdème est présent) suggère que l'effet osmotique qu'exerce l'accumulation de glutamine dans les astrocytes, n'est pas à lui seul responsable de l'augmentation de la teneur en eau du

cerveau lors d'une IHA due à une dévascularisation hépatique. Cette affirmation est renforcée par les résultats obtenus dans l'article 3 qui a utilisé l'hypothermie. Les auteurs ont rapporté que l'hypothermie, suffisante pour abolir l'œdème cérébral, ne prévenait ni l'augmentation des concentrations cérébrales de glutamine, ni l'augmentation de sa synthèse *de novo* à partir du glucose dans les astrocytes. Un effet identique de l'hypothermie sur l'œdème cérébral et les taux de glutamine dans le cerveau a aussi été rapporté par le groupe du Dr Blei dans un modèle d'infusion d'ammoniaque (Cordoba et coll., 1999).

Les résultats des expériences décrits dans l'article 3 confirment donc que l'effet osmotique de la glutamine n'est pas, à lui seul, suffisant pour induire l'œdème cérébral. Donc, si on suppose que les propriétés osmotiques de la glutamine ne sont pas un facteur majeur impliqué dans l'apparition de l'œdème cérébral, on peut alors assumer que la protection observée avec l'utilisation de la MSO n'implique pas un effet osmotique de la glutamine. Alors, on peut supposer que la glutamine a d'autres effets en plus d'agir sur la pression osmotique. Ainsi, une étude récente a rapporté que la glutamine était capable d'inhiber l'autorégulation du DSC (Okada et coll., 2000) et qu'elle serait donc capable d'influencer l'apparition de l'œdème cérébral en agissant sur la pression hydrostatique (voir paragraphe 6.2 du chapitre d'introduction). Il a aussi été récemment démontré *in vitro* que la glutamine induisait un stress oxydatif dans les astrocytes spécifiquement, stress qui pourrait être impliqué dans la dysfonction astrocytaire que l'on pense être associée à l'œdème cérébral lors d'une IHA (Rama Rao et coll., 2005). Il est donc possible que la MSO, en prévenant les augmentations des taux de glutamine dans le cerveau, prévienne les effets décrits ci-dessus.

En conclusion, on peut dire que nos résultats suggèrent que contrairement aux affirmations passées, la glutamine ne serait pas l'osmolyte cérébral directement lié à l'apparition de l'œdème cérébral, mais qu'elle pourrait être impliquée dans son développement par d'autres mécanismes. De tels mécanismes restent encore à étudier.

3.1.2. Rôle joué par l'accumulation de lactate et d'alanine

Comme il l'a été cité précédemment, si l'effet osmotique de la glutamine ne joue pas un rôle direct dans la pathogenèse de l'œdème cérébral, il faut donc se tourner vers d'autres candidats ayant un effet osmotique sur le cerveau pour expliquer une entrée d'eau dans le cerveau. L'utilisation de l'hypothermie dans les études 1 et 3 a permis de suggérer deux nouveaux osmolytes. L'observation, dans ces deux études, que la prévention de l'apparition de l'œdème cérébral s'accompagnait de la normalisation des niveaux et de la synthèse *de novo* du lactate et de l'alanine dans le cerveau de rats ayant une dévascularisation hépatique indique que ces deux composés seraient directement impliqués dans l'étiologie de l'œdème cérébral lors d'une IHA. De plus, l'étude 2 rapporte une forte corrélation entre les taux de lactate cérébral et l'œdème cérébral, d'une part et entre les taux de lactate et la sévérité de l'encéphalopathie, d'autre part. L'étude 2 a aussi rapporté des corrélations similaires pour les taux d'alanine cérébrale.

L'étendue de la contribution du lactate et de l'alanine à la pathogenèse de l'œdème cérébral lors d'une IHA n'est pas encore claire. Cependant, les résultats de l'étude 1 rapportent que l'augmentation des taux de lactate dans le LCR est maximale au stade de coma de l'EH, stade où l'œdème cérébral est maximal. De plus, des niveaux cérébraux élevés de lactate ont été rapportés comme étant associés à une

hypertension intracrânienne et à de mauvais pronostics lors d'une IHA chez des chiens (Nyberg et coll., 1998). Enfin, l'exposition d'astrocytes en culture au lactate induit un gonflement significatif de ces cellules (Staub et coll., 1990).

Aussi, dans le cas de l'alanine, il existe une corrélation étroite entre les concentrations d'alanine dans le LCR et le degré de dysfonction neurologique (Mans et coll., 1994) et l'œdème cérébral (Swain et coll., 1992a) chez le rat. Il a aussi été démontré que l'alanine et la glutamine sont toutes deux capables d'induire un gonflement des hépatocytes (Haussinger., 1996) et donc il est possible que l'accumulation d'alanine dans le cerveau puisse conduire à un gonflement des astrocytes et à l'apparition de l'œdème cérébral.

3.1.3. Rôle joué par l'acidose lactique.

Le lactate peut participer à l'apparition de l'œdème cérébral en induisant une acidose. Une des rares études n'impliquant pas une ischémie cérébrale a été menée par Petito et coll en 1987, afin de mieux comprendre quels étaient les mécanismes impliqués dans l'apparition d'un gonflement des cellules lors d'une acidose lactique. Les auteurs ont rapporté que l'injection intracorticale de sodium-lactate induisait un gonflement des astrocytes (Petito et coll., 1987). Il a été proposé que l'acidose lactique génère un excès d'ions hydrogènes qui vont induire une baisse du pH intracellulaire lorsque les capacités de tamponnage de la cellule sont excédées ou compromises. Petito et coll. ont attribué l'apparition d'un gonflement des astocytes lors d'une acidose lactique à une déficience des systèmes de transport membranaire ainsi que d'une induction, par le lactate, de la production, dépendante du fer, de radicaux libres (Petito et coll., 1987).

Au jour d'aujourd'hui, toutes les évidences obtenues découlent d'expériences menées *in vitro*. Staub et coll. ont été les premiers à étudier les effets du lactate extracellulaire sur le volume d'astrocytes en culture (Staub et coll., 1990). Ils ont rapporté un gonflement cellulaire qui était prévenu par le remplacement dans le milieu de culture du Na^+ et du bicarbonate, ce qui leur a permis de suggérer que les transporteurs membranaires de ces composés étaient impliqués dans l'apparition de l'œdème cellulaire. Plus récemment, Plesnila et coll. ont démontré dans deux séries d'expériences menées *in vitro* avec des cellules de gliome C6, que les astrocytes gonflent en réponse à l'acidose et que ce gonflement est dépendant des transporteurs membranaires responsables de la régulation du pH intracellulaire (Plesnila et coll., 1999); plus précisément que le gonflement et l'acidose intracellulaire causés par l'exposition au lactate sont la conséquence de l'activation du cotransporteur $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$ et de l'échangeur indépendant du $\text{Na}^+ \text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Ringel et coll., 2000). L'échangeur cause un net efflux de bicarbonate qui entraîne une accumulation nette de Cl^- dans la cellule. Cette accumulation conduira au gonflement de la cellule et à une acidification du pH intracellulaire. Aussi, l'activation du cotransporteur $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$ va conduire à une accumulation de solutés dans la cellule qui vont participer au gonflement de cette dernière.

Il a aussi été démontré *in vitro* que l'acidose lactique inhibe la capacité de capture du glutamate par les astrocytes (Bender et coll., 1997). Cette observation est très pertinente puisque dans le cas d'une IHA, on observe à la fois des niveaux extracellulaires élevés de lactate (Chatauret et coll., 2001; Tofteng et Larsen., 2002) ainsi que de glutamate (Tofteng et Larsen., 2002; Rose., 2002). Le rôle exact joué par le lactate dans l'apparition de l'œdème cérébral et des niveaux élevés de glutamate

extracellulaire lors d'une IHA, ou le fait de savoir si les niveaux de lactate extracellulaire élevés observés lors d'une IHA sont la cause ou la conséquence des élévations des taux de glutamate extracellulaire n'ont jamais été étudiés. L'utilisation de molécules diminuant la formation de lactate telles que le dichloroacétate (Marangos et coll., 1999) et la méthylprednisolone (Farooque et coll., 1996) pourrait permettre de répondre en partie à ces questions.

Malgré toutes ces évidences suggérant que le lactate et l'alanine jouent un rôle direct dans l'étiologie de l'œdème cérébral lors d'une IHA, il faut néanmoins noter que comme dans le cas de la glutamine, des taux cérébraux de lactate et d'alanine élevés sont une manifestation présente à la fois lors d'une insuffisance hépatique aiguë (Hawkins et coll., 1973; Holmin et coll., 1983; Swain et coll., 1992a; Mans et coll., 1994) et chronique (Hindfelt et coll., 1977; Yao et coll., 1987; Therrien et coll., 1991; Rao et coll., 1995; Hilgier et coll., 1999) et que l'œdème cérébral est généralement spécifique à la forme aiguë. Il est concevable que des mécanismes compensatoires soient présents lors d'une insuffisance hépatique chronique qui fassent que les astrocytes soient moins vulnérables au gonflement induit par le lactate et l'alanine. D'autres études seront nécessaires afin de vérifier cette possibilité.

En conclusion, les rôles joués par l'alanine, le lactate et l'acidose lactique dans le développement de l'œdème cérébral lors d'une IHA ne sont pas encore clairement établis, cependant le fait que les niveaux cérébraux de ces deux composés soient corrélés étroitement avec la présence de l'œdème cérébral nous amène à penser que ces derniers joueraient un rôle plus direct que la glutamine dans l'étiologie de l'œdème cérébral lors d'une IHA induite par une dévascularisation hépatique.

3.2. Augmentation du débit sanguin cérébral lors d'une IHA

Les perturbations du métabolisme du glucose décrites dans cette thèse peuvent conduire aux changements du DSC observés lors d'une IHA (voir paragraphe 6.2 du chapitre 1) de plusieurs façons.

3.2.1. Rôle du lactate

Larsen et coll. rapportent qu'une acidose lactique, causée par une augmentation de la teneur en lactate, a des effets vasodilatateurs puissants (Larsen et Wendon., 2002).

3.2.2. Rôle de la glutamine

Un rôle possible de la glutamine dans les changements du DSC lors d'une hyperammoniémie, a été démontré par l'utilisation de la MSO, dans un modèle animal d'infusion d'ammoniaque (Master et coll., 1999). Dans ce modèle l'inhibition de la synthèse de glutamine prévenait l'augmentation du DSC et l'apparition de l'œdème cérébral. La MSO restaure aussi la réponse au CO₂ chez des rats hyperammoniémiques, suggérant que la glutamine générée lors de l'hyperammoniémie affecterait le DSC en perturbant l'autorégulation cérébrovasculaire (Takahashi et coll., 1991). De fait, un effet inhibiteur de la glutamine sur la réactivité cérébrovasculaire au CO₂ via une vasoconstriction (due à une inhibition de la production de NO) a été rapporté chez des rats normaux (Okada et coll., 2000). Il faut noter toutefois que l'on attribue la perte de l'autorégulation du DSC lors d'une IHA à une vasodilatation et non à une vasoconstriction (Larsen et

coll., 1996). Ces observations ne supportent donc pas l'hypothèse d'un effet direct de la glutamine sur l'autorégulation du DSC lors d'une hyperammoniémie.

De fait, l'hypothermie prévient l'augmentation du DSC et l'apparition de l'œdème cérébral lors d'une IHA humaine (Jalan et coll., 1999) et expérimentale (Cordoba et coll., 1999) sans affecter les niveaux de glutamine dans le cerveau (voir paragraphe précédent). Chez l'humain, l'utilisation de l'hypothermie a mis en évidence que la réduction du DSC et de l'œdème cérébral s'accompagne d'une augmentation de la résistance vasculaire cérébrale (Jalan et coll., 1999). Cette observation suggère que l'effet protecteur de l'hypothermie passerait, au moins en partie, par une vasoconstriction. L'hypothèse selon laquelle la glutamine ne jouerait qu'un rôle indirect dans l'élévation du DSC est renforcée par les observations que l'administration d'indométhacine (un vasoconstricteur puissant) améliore le DSC, l'œdème cérébral et la PIC lors d'une IHA humaine (Tofteng et Larsen., 2004) et expérimentale (Chung et coll., 2001), et que dans le cas de l'IHA expérimentale, l'indométhacine n'avait aucune influence sur les niveaux cérébraux de glutamine. L'interprétation des résultats obtenus avec l'hypothermie et l'indométhacine sont complémentaires et suggèrent qu'une vasodilatation cérébrale plutôt que des taux élevés de glutamine serait responsable de l'augmentation du DSC observée lors d'une IHA. Ces résultats suggèrent aussi qu'une augmentation du DSC est indispensable à l'apparition de l'œdème cérébral lors d'une hyperammoniémie.

3.2.3. Rôle du glutamate extracellulaire

Il semblerait donc que les résultats obtenus avec la MSO soient dus au fait que la MSO n'affecte pas uniquement le métabolisme de la glutamine. En effet

l'inhibition de la synthèse de glutamine par la MSO entraîne aussi une diminution des niveaux de glutamate extracellulaire chez le lapin en diminuant la disponibilité de la glutamine comme précurseur et en stimulant la capture du glutamate par les cellules gliales (Bottcher et coll., 2003).

Il a été démontré que l'activation des récepteurs au glutamate de type NMDA induit une hyperémie cérébrale via la production de NO (Yang et Chang., 1998) et on sait que les niveaux de glutamate extracellulaire sont élevés lors d'une IHA (Michalak et coll., 1996; Rose., 2002). Il est donc possible que lors d'une IHA les taux élevés de glutamate extracellulaire soient responsables de l'hyperémie en sur-activant les récepteurs NMDA. Le rôle d'une sur-activation des récepteurs NMDA dans l'étiologie de l'œdème cérébral est supporté par le rapport d'une diminution de ce dernier avec l'utilisation de la mémantine (un antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA) lors d'une IHA (Vogels et coll., 1997).

L'effet de la MSO sur le DSC pourrait donc être médié par une réduction des taux de glutamate extracellulaire subséquente à la baisse des niveaux de glutamine qui diminuerait l'activation des récepteurs NMDA. De plus, il a aussi été démontré que l'hypothermie prévenait les augmentations de glutamate extracellulaire lors d'une IHA (Rose et coll., 2000). Il est donc possible que l'effet de la MSO et de l'hypothermie sur le DSC passe par une prévention de l'activation des récepteurs NMDA. Des études de microdialyse seraient nécessaires afin de déterminer quels sont les effets exacts de la MSO sur les taux cérébraux de glutamate extracellulaire lors d'une IHA.

Cependant, la voie de transduction des récepteurs au NMDA conduisant à la vasodilatation responsable de l'augmentation du DSC implique une production de NO

par les neurones. Une étude utilisant des inhibiteurs spécifiques de la synthèse neuronale et non-neuronale de NO n'a pu prévenir l'augmentation du DSC lors d'une hyperammoniémie (Larsen et coll., 2001). Donc l'hypothèse de la sur-activation des récepteurs NMDA comme étant le principal responsable de l'hyperémie cérébrale n'est pas entièrement valide et on peut alors supposer que d'autres mécanismes vasodilatateurs seraient impliqués lors d'une IHA.

En conclusion, on peut dire que les effets de l'hyperammoniémie sur le DSC sont extrêmement complexes et que d'autres études seront nécessaires afin de mieux les comprendre. On peut déduire que, bien que le DSC n'ait jamais été mesuré dans le modèle d'IHA induite par une dévascularisation hépatique, l'absence de corrélation présentée dans les articles 2 et 3, entre les taux ainsi que la synthèse de glutamine et l'œdème cérébral lors d'une IHA renforce l'idée que la glutamine n'influence pas l'œdème cérébral par un effet direct sur l'osmolarité du cerveau ni sur le DSC. On peut aussi avancer que l'effet protecteur de l'hypothermie observé dans l'article 3 passerait par une amélioration du DSC soit en induisant directement une vasoconstriction, soit en réduisant les taux de glutamate extracellulaire. On peut aussi avancer que l'effet protecteur de la MSO n'est pas directement lié à son effet sur la synthèse de glutamine.

4. DÉTOXICATION DE L'AMMONIAQUE PAR LE CERVEAU ET LES MUSCLES SQUELETTIQUES LORS D'UNE IHA.

Dans les conditions normales, le foie est le principal organe responsable de la détoxification de l'ammoniaque en synthétisant à la fois de l'urée et de la glutamine (voir paragraphe 3.3 du chapitre d'introduction). Lors d'une IHA, la capacité

d'uréogénèse du foie est diminuée. Cette diminution de la synthèse d'urée va être responsable de l'augmentation des niveaux circulants d'ammoniaque. Contrairement au foie, le cerveau et les muscles squelettiques sont dépourvus d'un cycle de l'urée complet et s'appuient donc uniquement sur la synthèse de glutamine pour détoxifier les concentrations croissantes d'ammoniaque.

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 2.2.2.4 de ce chapitre, la synthèse de glutamine dans le cerveau n'augmente pas en réponse aux élévations des niveaux d'ammoniaque (article 2). En revanche, des études menées chez l'humain ou dans des modèles expérimentaux ont rapporté des augmentations de la libération de glutamine par les muscles squelettiques (Ganda et Ruderman., 1976; Hod et coll., 1982). De plus, il a été démontré que l'activité de la GS musculaire était significativement augmentée suite à une hyperammoniémie causée par une insuffisance hépatique chronique (Girard et Butterworth., 1992; Desjardins et coll., 1999). Il semblerait donc que le cerveau et les muscles squelettiques répondent différemment aux élévations des taux d'ammoniaque circulant. Dans l'article 4 de cette thèse, nous avons vérifié cette affirmation en examinant les effets de l'hyperammoniémie associée à une IHA sur l'activité et l'expression de la GS dans le cerveau et les muscles squelettiques de rats ayant une dévascularisation hépatique.

4.1. Métabolisme musculaire de l'ammoniaque.

4.1.1. Expression et activité de la GS musculaire

Les résultats de l'article 4 de cette thèse révèlent une augmentation significative de l'activité enzymatique et des niveaux de protéine de la GS dans les

muscles squelettiques de rats ayant une IHA. Ces augmentations étaient précoces puisqu'elles étaient détectables dans les 6 heures suivant la ligature de l'artère hépatique (stade auquel aucun symptôme neurologique n'est encore détectable). Les augmentations des niveaux d'expression de la protéine GS n'étaient cependant pas accompagnées d'une augmentation de l'expression du gène de la GS, ce qui indique que les augmentations de l'activité de la GS sont la conséquence de modifications post-transcriptionnelles.

Des augmentations de l'activité de la GS ont été rapportées dans le passé lors d'une insuffisance hépatique chronique expérimentale (Girard et Butterworth., 1992; Desjardins et coll., 1999) et des augmentations de la libération de glutamine par les muscles squelettiques ont aussi été observées chez des patients souffrant d'une cirrhose décompensée (Ganda et Ruderman., 1976). Aussi, l'occlusion en deux étapes de la veine porte chez le rat induit une augmentation de l'activité de la GS musculaire (Hod et coll., 1982).

L'augmentation de l'activité de la GS musculaire décrite dans l'article 4 de cette thèse était corrélée avec les concentrations d'ammoniaque artériel. Cette observation est en accord avec les résultats d'études précédentes menées chez l'humain et dans des modèles expérimentaux ayant une hyperammoniémie d'étiologies variées (Bessman et Bradley., 1955; Webster et Gabuzda., 1958; Ganda et Ruderman., 1976). Ces augmentations de l'expression et de l'activité de la GS musculaire suggèrent que la capacité de production de glutamine est augmentée dans les muscles en réponse aux élévations des taux d'ammoniaque causées par l'IHA.

4.1.2. Production musculaire de glutamine

L'induction de la GS musculaire décrite dans l'article 4 s'accompagne d'une diminution de la différence artérioveineuse (A-V) de la glutamine au niveau des membres postérieurs de rats ayant une IHA. Cette diminution de la différence (A-V) représente une libération de glutamine par le muscle, cependant cette différence n'est pas un bon indicateur du taux de libération de glutamine par le muscle puisque celui-ci dépend du débit sanguin au travers de l'organe.

De fait, le débit sanguin au travers des muscles du membre postérieur était augmenté 6 heures après la LAH et cette observation est en accord avec la présence d'une circulation hyperdynamique qui est caractéristique de l'IHA (Schneider et coll., 1994; Ellis et Wendon., 1996).

Ensemble, les mesures de débit sanguin musculaire et des différences (A-V) de glutamine ont permis d'estimer la production de glutamine par le muscle. L'article 4 rapporte que l'induction de la GS musculaire lors d'une IHA mène à une augmentation de 15 fois de la libération de glutamine par le muscle dans ce modèle d'IHA. Une libération accrue de glutamine par le muscle a déjà été rapportée dans d'autres modèles hyperammonémiques (Ganda et Ruderman., 1976; Hod et coll., 1982). De plus, les résultats d'une étude récente menée sur 7 patients souffrant d'une IHA due à une surdose d'acétaminophène ou à une insulte hépatique virale, ont montré une augmentation significative de la libération de glutamine par les muscles de la jambe (Clemmesen et coll., 2000). Une augmentation de la libération de glutamine suggère que la capacité de production de glutamine et donc d'élimination de l'ammoniaque est accrue dans le muscle suite à une IHA.

4.1.3. Élimination de l'ammoniaque par le muscle.

Clemmesen et coll. (2000) ont considéré que l'augmentation de la libération musculaire de glutamine chez l'humain représentait une augmentation de la détoxification de l'ammoniaque puisque la capture d'ammoniaque par le muscle était corrélée de façon significative avec la libération de glutamine. Dans cette étude, les auteurs ont rapporté une différence artério-veineuse d'ammoniaque de 50 μM au niveau de la jambe. Aussi, une capture nette de l'ammoniaque par le muscle a été rapportée chez des patients ayant une cirrhose décompensée en mesurant les différences artério-veineuse au niveau de l'avant bras (Bessman et Bradley., 1955; Webster et Gabuzda., 1958; Ganda et Ruderman., 1976) et de la jambe (Tyor et coll., 1960). Enfin, l'infusion d'ammoniaque à des chiens normaux (Fine., 1985) et à des rats (Rosado et coll., 1962) induit une augmentation de la capture musculaire d'ammoniaque.

Dans l'article 4, les différences (A-V) étaient augmentées 5,2 fois, ce qui confirme les observations citées précédemment. En revanche, ces résultats sont en contradiction avec une étude utilisant un modèle animal similaire qui n'a pu rapporter des différences artério-veineuses significativement différentes de 0 (Dejong et coll., 1992). Cette contradiction peut s'expliquer par plusieurs raisons : (1) les sites de prélèvement de sang sont différents ; (2) les animaux sont à des stades de l'encéphalopathie différents malgré que les temps post-LAH soient identiques, ce qui suggère que la progression de l'encéphalopathie est différente entre les deux modèles ; (3) la température corporelle des animaux de l'étude de Dejong et al. a été maintenue à 34-36°C, température qui est considérée comme étant une hypothermie légère et qui pourrait avoir affecté le métabolisme musculaire de l'ammoniaque.

Dans l'article 4, après avoir pris en compte le débit sanguin musculaire, il a été rapporté que l'augmentation des différences (A-V) de l'ammoniaque représentait une augmentation de l'élimination de l'ammoniaque par le muscle.

4.1.4. Production de glutamine comme moyen de détoxication de l'ammoniaque.

L'observation concomitante d'une production de glutamine et d'une consommation d'ammoniaque par le muscle a permis de suggérer que la glutamine synthétisée par le muscle représente la détoxication de l'ammoniaque. Cependant, il faut noter que dans l'article 4, la production de glutamine est 4 fois plus élevée que la consommation d'ammoniaque ce qui suggère que la détoxication de l'ammoniaque n'est pas la seule source de production de glutamine par le muscle dans l'IHA. Ce phénomène a aussi été rapporté par Clemmesen et coll. (2000) chez les patients ayant une IHA. Dans cette étude les auteurs ont observé une production totale d'acides aminés par les muscles 10 fois supérieure à la consommation d'ammoniaque. Ils en ont déduit que la production de glutamine par le muscle était due en partie à un catabolisme des protéines musculaires. Des phénomènes similaires ont été décrits chez les patients cirrhotiques (Olde Damink et coll., 2002b) et dans des modèles animaux d'insuffisance hépatique chronique (Deutz et coll., 1996). Néanmoins, Clemmesen et coll. (2000) ont rapporté que 30% de l'ammoniaque libéré dans la circulation splanchnique chez des patients souffrant d'IHA était éliminé par le muscle sous forme de glutamine. Dans l'article 4, l'utilisation de la spectroscopie de RMN au $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ a permis de confirmer que l'induction de l'expression et de l'activité de la GS conduisait à une augmentation significative de la synthèse *de novo* de glutamine à

partir du glucose dans le muscle squelettique lors d'une IHA. Cette observation suggère irrévocablement qu'une augmentation de la détoxication d'ammoniaque par le muscle via la production de glutamine a bien lieu lors d'une IHA.

4.2. Métabolisme cérébral de l'ammoniaque

Les résultats de l'article 4 de cette thèse démontrent que, contrairement aux muscles squelettiques, l'expression et l'activité enzymatique de la GS ne sont pas augmentées dans le cerveau lors d'une IHA. De légères pertes de niveau d'expression et d'activité ont même été notées dans le cortex cérébral 6 heures après la LAH. Cette perte d'activité de la GS pourrait être le résultat d'altérations de la morphologie des astrocytes qui est caractéristique lors d'une insuffisance hépatique ou encore être la conséquence d'une diminution de la disponibilité du glutamate qui est le substrat de l'enzyme. Cette dernière hypothèse est supportée par l'observation, dans le même modèle animal, d'une diminution de la capacité de capture du glutamate par les astrocytes et ce à cause d'une diminution de l'expression du transporteur astrocytaire du glutamate GLT-1 (Knecht et coll., 1997). De plus, une nitration de la GS a été rapportée dans des cultures d'astrocytes exposées à des concentrations d'ammoniaque comparables à celles observées dans le cerveau lors d'une IHA (Schliess et coll., 2002). Cette nitration de la GS était accompagnée d'une perte de l'activité de la GS de 30%. Les résultats de cette thèse soulignant l'absence d'induction de la GS dans le cerveau viennent s'ajouter aux évidences démontrant que l'hyperammoniémie ne conduit pas à une augmentation de la capacité du cerveau à détoxiquer l'ammoniaque (Colombo et coll., 1977; Cooper et coll., 1985; Ukida et coll., 1988; Girard et Butterworth., 1992; Girard et coll., 1993).

Cette absence d'induction de l'activité de la GS dans le cerveau reflète le manque d'adaptabilité du cerveau afin de faire face aux augmentations des taux d'ammoniaque. Cependant, on notera que les articles 2 et 3 de cette thèse ont rapporté des augmentations de la synthèse *de novo* de glutamine dans le cerveau. Ces augmentations sont la conséquence d'une plus grande abondance du co-substrat de l'enzyme c'est-à-dire l'ammoniaque. L'activité de base de la GS cérébrale est néanmoins réduite et vite saturée par les niveaux croissants d'ammoniaque présents dans le sang et le cerveau lors d'une IHA.

En conclusion, l'IHA causée chez le rat par une dévascularisation hépatique résulte en une augmentation rapide et soutenue de l'activité de la GS dans les muscles squelettiques, augmentation qui est la conséquence de modifications post-transcriptionnelles. L'induction de la protéine GS et de son activité enzymatique dans les muscles squelettiques lors d'une IHA conduit à une augmentation de la synthèse de la glutamine et donc à une augmentation de l'élimination de l'ammoniaque par les muscles. Une telle induction n'est pas présente dans le cerveau. Ces données suggèrent que la préservation de la masse musculaire en combinaison avec l'utilisation de composés capables de stimuler la capacité de la GS musculaire pourraient être des traitements efficaces pour diminuer les niveaux d'ammoniaque plasmatique lors d'une IHA. Il a été rapporté que l'ornithine-aspartate (OA) serait un tel composé. En effet, il a été démontré que OA diminuait les niveaux d'ammoniaque circulant en induisant une stimulation post-traductionnelle de l'activité de la GS musculaire (Rose et coll., 1999). Ce traitement conduisait à un ralentissement de la progression de l'encéphalopathie et à une réduction du contenu cérébral en eau chez

ces animaux. Des études cliniques contrôlées seront nécessaires afin de déterminer l'efficacité de ces nouvelles approches thérapeutiques lors d'une IHA chez l'humain.

CHAPITRE 4

CONCLUSIONS

Les résultats de cette thèse démontrent que:

Article 1:

- L'hypothermie prévient l'apparition de l'œdème cérébral et ralentit le développement de l'encéphalopathie lors d'une IHA expérimentale.
- L'effet bénéfique de l'hypothermie dans l'IHA implique une diminution des niveaux d'ammoniaque et de lactate dans le LCR, ce qui suggère que l'hypothermie aurait un effet sur le métabolisme énergétique cérébral.

Article 2:

- L'IHA expérimentale s'accompagne d'élévations des concentrations cérébrales de glutamine, de lactate et d'alanine telles que mesurées par ^1H -RMN.
- L'utilisation de la RMN au ^{13}C a révélé que ces élévations étaient la conséquence d'une augmentation sélective de leur synthèse *de novo*.
- La diminution sélective des taux de glutamate au stade du coma était principalement causée par la diminution du flux de glucose via la voie de la pyruvate déshydrogénase.
- L'augmentation de la synthèse *de novo* de lactate et d'alanine ainsi que la diminution de la synthèse *de novo* de glutamate sont en accord avec une stimulation relative du flux glycolytique et une diminution concomitante du flux à travers du cycle de Krebs au stade du coma dans l'IHA.
- Contrairement à la synthèse de glutamine, la synthèse du lactate et de l'alanine était corrélée avec la sévérité de l'encéphalopathie et l'œdème

cérébral, suggérant que le lactate et l'alanine joueraient un rôle plus direct que la glutamine dans l'apparition de ces symptômes.

- Donc, des altérations du métabolisme cellulaire du glucose et du métabolisme énergétique plutôt qu'une accumulation par les astrocytes de glutamine, sont les causes majeures de l'encéphalopathie et de l'œdème cérébral dans ce modèle d'IHA.

Article 3:

- L'hypothermie, suffisante pour prévenir l'encéphalopathie et l'œdème cérébral lors d'une IHA, n'avait aucun effet sur les niveaux et la synthèse de glutamine, ce qui confirme que l'accumulation intracellulaire de glutamine dans les astrocytes joue un rôle mineur dans l'étiologie de l'œdème cérébral et de l'encéphalopathie.
- L'hypothermie prévient sélectivement l'élévation de la concentration et de la synthèse de lactate et d'alanine, confirmant que ces deux composés pourraient jouer un rôle clef dans le développement de l'œdème cérébral dans l'IHA.
- La corrélation entre l'augmentation du flux de glucose via la glycolyse (synthèse *de novo* de lactate et d'aspartate) et la sévérité de l'encéphalopathie et l'œdème cérébral suggère qu'un déficit de l'oxydation du glucose et du métabolisme énergétique est un facteur majeur contribuant aux complications neurologiques de l'IHA.

Article 4 :

- L'IHA causée par une dévascularisation hépatique conduit à une augmentation rapide et soutenue de l'activité de la GS dans les muscles squelettiques.
- L'induction de l'expression de la GS dans le muscle est la conséquence de modifications post-transcriptionnelles.
- Cette induction de la GS musculaire mène à une augmentation de la production de glutamine et de la détoxication de l'ammoniaque par les muscles.
- Cette induction de la GS n'est pas présente au niveau du cerveau et on observe plutôt une diminution de l'expression et de l'activité de la GS.
- Ensemble, ces données suggèrent que le muscle devient l'organe principal responsable de la détoxication de l'ammoniaque lors d'une IHA. En conséquence, le muscle serait une cible thérapeutique potentielle dans le but d'augmenter l'élimination de l'ammoniaque plasmatique.

CHAPITRE 5

RÉSUMÉ

Lors d'une insuffisance hépatique aiguë, l'élimination par le foie de l'ammoniaque provenant principalement des intestins, est drastiquement diminuée voire complètement abolie. Cette diminution va avoir pour conséquence d'augmenter les taux plasmatiques d'ammoniaque. L'ammoniaque qui traverse facilement la barrière hémato-encéphalique, va donc entrer dans le cerveau où il va s'accumuler.

1. EFFET DE L'AMMONIAQUE SUR LE MÉTABOLISME CÉRÉBRAL.

L'ammoniaque agit sur la synthèse de plusieurs acides aminés et métabolites du glucose par des effets distincts sur divers voies métaboliques (Figure 1 de ce chapitre).

L'augmentation des taux cérébraux d'ammoniaque va entraîner une inhibition de la glutaminase qui va conduire à une perturbation du cycle glutamate-glutamine. Dans les neurones cette inhibition va avoir pour conséquence de réduire l'utilisation de la glutamine comme précurseur de la synthèse de glutamate, ce qui va être à l'origine de la baisse des niveaux de glutamate et à l'origine de l'accumulation de la glutamine dans le cerveau. Une inhibition de la glutaminase pourrait expliquer en partie que la synthèse *de novo* du glutamate par la voie de la PDH soit diminuée et que la synthèse de glutamine par la même voie soit augmentée.

Au niveau des astrocytes, l'hyperammoniémie va aussi induire une augmentation de la détoxification de l'ammoniaque via la synthèse de la glutamine par la voie de la PC. Cette stimulation de la synthèse de glutamine et l'inhibition de sa conversion en glutamate expliquent l'augmentation des taux de glutamine observée dans le cerveau lors d'une IHA.

L'ammoniaque exerce aussi un effet inhibiteur sur l' α -cétoglutarate déshydrogénase, ce qui va inhiber le cycle de Krebs et l'oxydation du glucose. Cette inhibition du cycle de Krebs est reflétée par une diminution des niveaux de N-acétylaspartate et vient s'ajouter à l'inhibition de la glutaminase pour conduire à une diminution de la synthèse de glutamate via la voie de la PDH. Ces dernières expliquent la diminution des niveaux de glutamate intracellulaire dans le cerveau lors d'une IHA. La baisse des taux de glutamate intracellulaire vient s'ajouter à un effet inhibiteur direct de l'ammoniaque sur les activités de la malate déshydrogénase et de l'aspartate aminotransférase, pour inhiber la navette malate/aspartate. Cette inhibition de la navette va stimuler la glycolyse afin de maintenir les niveaux d'équivalents réducteurs. L'activité glycolytique est aussi stimulée directement par l'ammoniaque via une stimulation de l'activité de la phosphofructokinase.

L'hyperammoniémie associée à l'IHA va être responsable de la diminution de la capture du glutamate par les astrocytes et va aussi être responsable d'une augmentation de la libération de glutamate par les terminaisons nerveuses. Ces deux phénomènes conduisent à une élévation des taux de glutamate extracellulaire qui va entraîner une sur-activation des récepteurs glutamatergiques de type NMDA. La sur-activation des récepteurs NMDA va faciliter l'entrée d'ions sodium dans les cellules

ce qui entraîne une activation de la pompe Na^+/K^+ ATPase afin de rétablir le gradient de sodium. Cette activation de la Na^+/K^+ ATPase va accroître la consommation d'ATP qui en retour va stimuler la glycolyse.

L'augmentation de l'activité glycolytique, ainsi que l'inhibition du cycle de Krebs qui ont été citées précédemment, vont induire une accumulation de pyruvate qui va, par un effet de masse, stimuler la synthèse de lactate et d'alanine. En résumé, on va donc observer une augmentation des niveaux de lactate, d'alanine et de glutamine ainsi qu'une baisse des niveaux de glutamate intracellulaire dans le cerveau lors d'une IHA induite par une dévascularisation hépatique.

2. CONSÉQUENCES NEUROLOGIQUES DES ALTÉRATIONS DU MÉTABOLISME CÉRÉBRAL.

Les altérations du métabolisme du glucose induites par l'ammoniaque vont avoir des conséquences cérébrales qui sont résumées dans la figure 2 de ce chapitre.

L'augmentation des niveaux cérébraux d'alanine, de lactate et de glutamine (omise pour des raisons de clarté) peuvent entraîner des perturbations osmotiques et conduire à une entrée d'eau dans le cerveau.

Les augmentations des niveaux de lactate et de glutamate extracellulaire vont conduire à une vasodilatation des artérioles cérébrales, le premier en induisant une acidose lactique et le deuxième en activant les récepteurs de type NMDA qui peuvent augmenter la production de NO. Cette vasodilatation serait responsable de la perte de l'autorégulation du débit sanguin cérébral qui va alors augmenter. Cette augmentation du DSC va élever la pression hydrostatique et cela va favoriser l'entrée d'eau dans le

cerveau. L'augmentation du DSC va aussi favoriser l'apport d'ammoniaque au cerveau et va entraîner une amplification des phénomènes décrits précédemment.

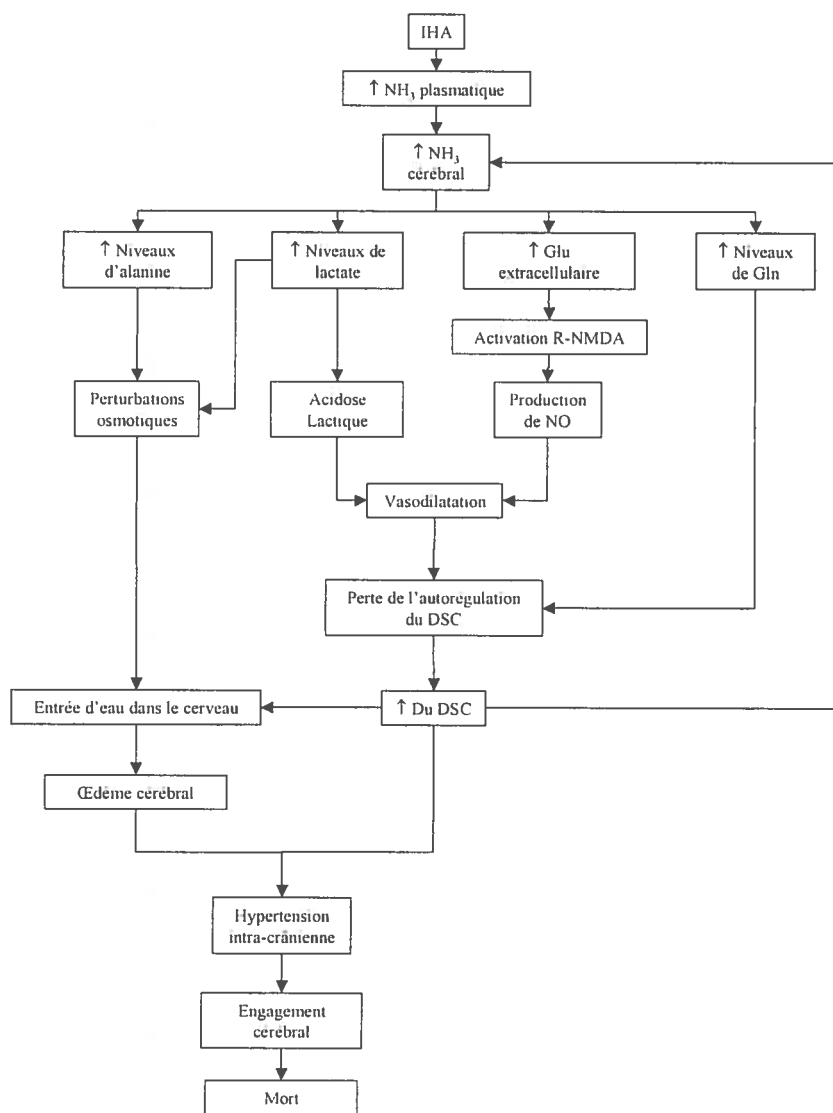


Figure 2: Conséquences potentielles des altérations du métabolisme cérébral du glucose par l'IHA.

Abréviations: DSC: Débit sanguin cérébral; IHA: Insuffisance hépatique aiguë; Gln: Glutamine; Glu: Glutamate; NO: Oxyde nitrique; R-NMDA: récepteur glutamatergique de type N-méthyl-D-aspartate.

L'œdème cérébral qui suit l'augmentation d'entrée d'eau dans le cerveau ainsi que l'augmentation du DSC sont à l'origine d'une hypertension intracrânienne qui peut entraîner un engagement cérébral et la mort.

3. EFFETS DE L'HYPOTHERMIE.

Selon les résultats décrits dans cette thèse, nous pouvons affirmer que l'hypothermie exerce un effet protecteur envers l'encéphalopathie et qu'elle abolit tous les changements métaboliques cérébraux mis à part l'élévation des niveaux de glutamine, lors d'une IHA. Une étude antérieure indique que l'hypothermie n'affecte pas les taux d'ammoniaque plasmatique mais qu'elle diminue significativement les niveaux d'ammoniaque dans le liquide céphalorachidien lors d'une IHA induite par une dévascularisation hépatique (Rose et coll., 2000). Il est donc probable que les effets bénéfiques de l'hypothermie qui sont observés sur quasiment toutes les voies métaboliques cérébrales affectées par l'hyperammoniémie, résident principalement dans sa capacité à prévenir les augmentations d'ammoniaque dans le cerveau. Cette réduction des niveaux d'ammoniaque cérébral pourrait être la conséquence d'une diminution induite par l'hypothermie du transfert d'ammoniaque du sang vers le cerveau, mais pourrait aussi passer par une réduction du débit sanguin cérébral, qui va indirectement réduire l'apport (et donc le transfert) d'ammoniaque au cerveau. Ainsi l'effet protecteur de l'hypothermie observé dans le modèle animal d'IHA résiderait dans sa capacité à prévenir la mise en place du cercle vicieux décrit dans la Figure 2 de ce chapitre.

Enfin, ces résultats viennent s'ajouter à ceux des études non contrôlées de l'effet protecteur de l'hypothermie chez l'humain, pour justifier la réalisation d'une

étude clinique contrôlée de l'effet de l'hypothermie lors d'une insuffisance hépatique aiguë.

4. ADAPTABILITÉ DE L'ORGANISME FACE À L'IHA ET L'HYPERAMMONIÉMIE.

L'adaptabilité de la capacité de synthèse de la glutamine des muscles squelettiques et du cerveau face aux élévations des taux d'ammoniaque lors d'une IHA est présentée dans la figure 3 de ce chapitre. Comme nous l'avons mentionné précédemment, les taux d'ammoniaque plasmatique augmentent lors de l'IHA.

Au niveau des muscles squelettiques cette élévation de l'ammoniémie va induire l'expression de la protéine GS et va conduire à une augmentation de son activité enzymatique. Cette augmentation d'activité conduit à des augmentations concomitantes de la synthèse *de novo* de glutamine et de la consommation d'ammoniaque par le muscle qui représentent une augmentation de la capacité musculaire de détoxication de l'ammoniaque. Il semble donc que les muscles deviennent un organe important pour l'élimination de l'ammoniaque lorsque la fonction hépatique est abolie. En conséquence, ces résultats suggèrent fortement qu'il est important de maintenir la masse musculaire chez le patient souffrant d'une IHA.

Contrairement au cas des muscles squelettiques, l'hyperammoniémie qui se développe lors d'une IHA va induire une accumulation d'ammoniaque au niveau du cerveau. Cette accumulation va diminuer l'expression de la GS cérébrale (par des mécanismes partiellement connus), mais aussi induire une nitration de la GS et une diminution de la disponibilité du glutamate pour la synthèse de glutamine. Ces trois effets vont avoir pour conséquence de diminuer l'activité de la GS. Cette baisse

d'activité implique donc qu'à l'inverse des muscles squelettiques, la capacité de détoxification de l'ammoniaque par le cerveau est dépassée par les taux croissants d'ammoniaque.

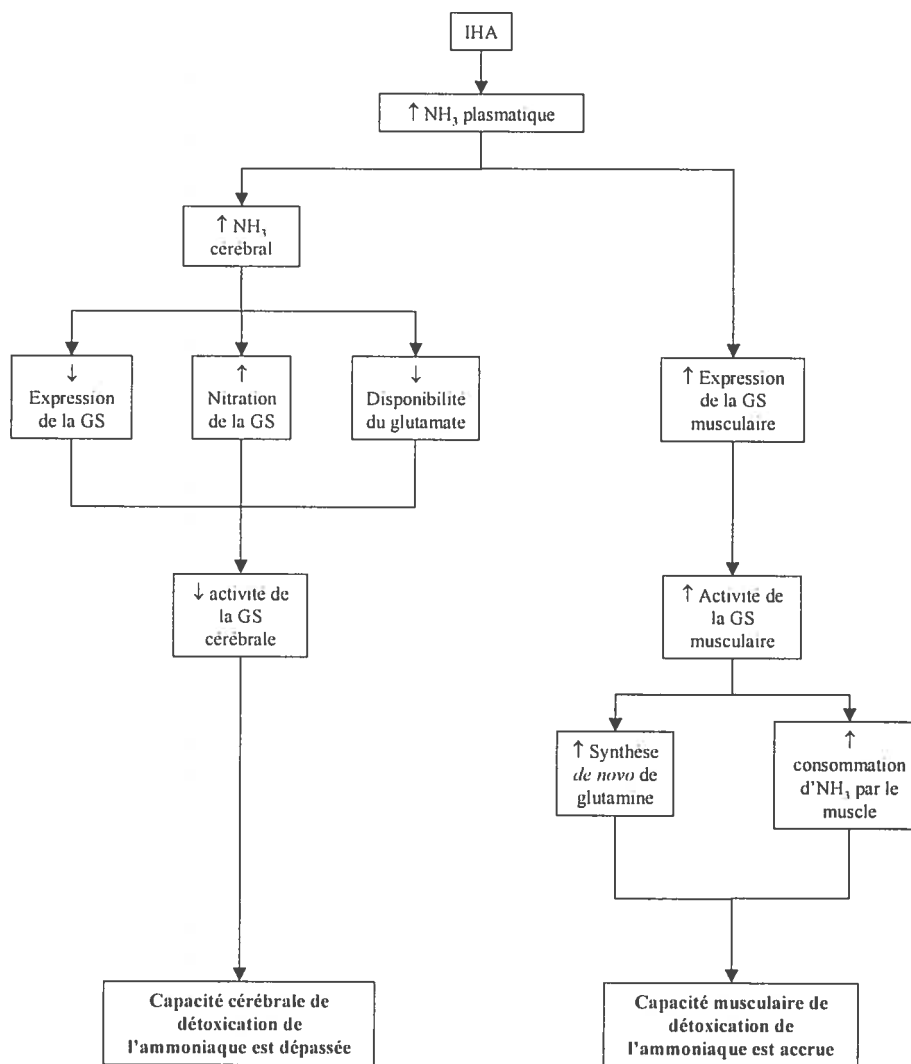


Figure 3 : Adaptabilité de la capacité de synthèse de glutamine des muscles squelettiques et du cerveau lors d'une hyperammoniémie due à une IHA. Abréviations : GS : Glutamine synthétase, NH₃ : Ammoniaque.

5. ÉTUDES FUTURES:

Les études suivantes sont suggérées comme étant une extension logique des expériences et travaux décrits dans cette thèse :

- Des études futures de RMN au ^{13}C et au ^{31}P , couplées à des études du DSC avec des animaux ayant une IHA, traités ou non avec un inhibiteur de la synthèse de lactate tel que le dichloroacétate, permettront d'examiner si l'augmentation de la synthèse de lactate est indispensable au maintien des niveaux d'ATP cérébraux dans l'IHA et si l'accumulation de lactate joue un rôle direct dans l'apparition de l'œdème cérébral et dans l'augmentation du DSC.
- Des études supplémentaires seront nécessaires afin de déterminer quels sont les mécanismes impliqués dans l'effet protecteur de la MSO décrit dans la littérature. Des études de RMN au ^{13}C et ^{31}P couplées à des études de microdialyse chez des animaux ayant une IHA, traités ou non avec la MSO, permettront de déterminer quels sont les effets de la MSO sur le métabolisme énergétique cérébral et aussi sur les niveaux de glutamate intra- et extracellulaire. Si on combine les études de microdialyse avec des mesures du DSC, on pourra examiner la corrélation entre les élévations du DSC avec les niveaux de glutamate extracellulaire.
- Aussi, on déterminera le rôle joué par l'activation des récepteurs au NMDA dans l'augmentation du DSC et des niveaux d'ammoniaque cérébraux, en utilisant un antagoniste de ces récepteurs comme la mémantine ou le SDZ 220-550, dans notre modèle d'IHA. On pourra aussi vérifier le rôle joué par le glutamate

extracellulaire dans l'étiologie de l'œdème cérébral en pré-traitant les animaux avec un antibiotique de la famille des β -lactames qui selon une étude récente auraient la capacité de réduire les niveaux de glutamate extracellulaire au niveau du cerveau en induisant l'expression et l'activité du transporteur astrocytaire du glutamate GLT1 (Rothstein et coll., 2005).

BIBLIOGRAPHIE

Abrahams S. L. et Younathan E. S. (1971). Modulation of the kinetic properties of phosphofructokinase by ammonium ions. *J Biol Chem* **246**, 2464-2467.

Albrecht J. et Dolinska M. (2001). Glutamine as a pathogenic factor in hepatic encephalopathy. *J Neurosci Res* **65**, 1-5.

Albrecht J. et Norenberg M. D. (1990). L-methionine-DL-sulfoximine induces massive efflux of glutamine from cortical astrocytes in primary culture. *Eur J Pharmacol* **182**, 587-589.

Albrecht J., Wysmyk-Cybula U., et Rafalowska U. (1985). Na⁺/K⁺-ATPase activity and GABA uptake in astroglial cell-enriched fractions and synaptosomes derived from rats in the early stage of experimental hepatogenic encephalopathy. *Acta Neurol Scand* **72**, 317-320.

Alexander S. C., Workman R. D., et Lambertsen C. J. (1962). Hyperthermia, lactic acid infusion, and the composition of arterial blood and cerebrospinal fluid. *Am J Physiol* **202**, 1049-1054.

Alger B. E. et Nicoll R. A. (1983). Ammonia does not selectively block IPSPs in rat hippocampal pyramidal cells. *J Neurophysiol* **49**, 1381-1391.

Alman R. W., Ehrmantraut W. R., Fazekas J. F., et Ticktin H. E. (1956). Cerebral metabolism in hepatic insufficiency. *Am J Med* **21**, 843-849.

Aoki C., Kaneko T., Starr A., et Pickel V. M. (1991). Identification of mitochondrial and non-mitochondrial glutaminase within select neurons and glia of rat forebrain by electron microscopic immunocytochemistry. *J Neurosci Res* **28**, 531-548.

Ascher N. L., Lake J. R., Emond J. C., et Roberts J. P. (1993). Liver transplantation for fulminant hepatic failure. *Arch Surg* **128**, 677-682.

Astrup J., Sorensen P. M., et Sorensen H. R. (1981). Oxygen and glucose consumption related to Na⁺-K⁺ transport in canine brain. *Stroke* **12**, 726-730.

Baba H., Zhang X. J., Kunkel K., et Wolfe R. R. (1994). Effect of hepatectomy on glucose metabolism in the dog. *Metabolism* **43**, 670-676.

Babij P., Matthews S. M., et Rennie M. J. (1983). Changes in blood ammonia, lactate and amino acids in relation to workload during bicycle ergometer exercise in man. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **50**, 405-411.

Baraldi M., Zeneroli M. L., Ventura E., Penne A., Pinelli G., Ricci P., et Santi M. (1984). Supersensitivity of benzodiazepine receptors in hepatic encephalopathy due to fulminant hepatic failure in the rat: reversal by a benzodiazepine antagonist. *Clin Sci (Lond)* **67**, 167-175.

Basile A. S. (2002). Direct and indirect enhancement of GABAergic neurotransmission by ammonia: implications for the pathogenesis of hyperammonemic syndromes. *Neurochem Int* **41**, 115-122.

Basile A. S., Harrison P. M., Hughes R. D., Gu Z. Q., Pannell L., McKinney A., Jones E. A., et Williams R. (1994). Relationship between plasma benzodiazepine receptor ligand concentrations and severity of hepatic encephalopathy. *Hepatology* **19**, 112-121.

Basile A. S., Jones E. A., et Skolnick P. (1991). The pathogenesis and treatment of hepatic encephalopathy: evidence for the involvement of benzodiazepine receptor ligands. *Pharmacol Rev* **43**, 27-71.

Bates T. E., Williams S. R., Busza A. L., Gadian D. G., et Proctor E. (1988). A 31P nuclear magnetic resonance study in vivo of metabolic abnormalities in rats with acute liver failure. *NMR Biomed* **1**, 67-73.

Bates T. E., Williams S. R., Kauppinen R. A., et Gadian D. G. (1989). Observation of cerebral metabolites in an animal model of acute liver failure in vivo: a ^1H and ^{31}P nuclear magnetic resonance study. *J Neurochem* **53**, 102-110.

Bender A. S. et Norenberg M. D. (2000). Effect of ammonia on GABA uptake and release in cultured astrocytes. *Neurochem Int* **36**, 389-395.

Bender A. S., Young L. P., et Norenberg M. D. (1997). Effect of lactic acid on L-glutamate uptake in cultured astrocytes: mechanistic considerations. *Brain Res* **750**, 59-66.

Berry M. N. (1967). The liver and lactic acidosis. *Proc R Soc Med* **60**, 1260-1262.

Bessman S. P. et Bradley J. E. (1955). Uptake of ammonia by muscle; its implications in ammoniagenic coma. *N Engl J Med* **253**, 1143-1147.

Bhatia V., Batra Y., et Acharya S. K. (2004). Prophylactic phenytoin does not improve cerebral edema or survival in acute liver failure--a controlled clinical trial. *J Hepatol* **41**, 89-96.

Bihari D., Gimson A. E., Lindridge J., et Williams R. (1985). Lactic acidosis in fulminant hepatic failure. Some aspects of pathogenesis and prognosis. *J Hepatol* **1**, 405-416.

Binstock L. et Lecar H. (1969). Ammonium ion currents in the squid giant axon. *J Gen Physiol* **53**, 342-361.

Bird S. P., Hewitt D., Ratcliffe B., et Gurr M. I. (1990). Effects of lactulose and lactitol on protein digestion and metabolism in conventional and germ free animal models: relevance of the results to their use in the treatment of portosystemic encephalopathy. *Gut* **31**, 1403-1406.

Blei A. T. (2005). The pathophysiology of brain edema in acute liver failure. *Neurochem Int* **47**, 71-77.

Blei A. T. et Larsen F. S. (1999). Pathophysiology of cerebral edema in fulminant hepatic failure. *J Hepatol* **31**, 771-776.

Blei A. T., Olafsson S., Therrien G., et Butterworth R. F. (1994). Ammonia-induced brain edema and intracranial hypertension in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology* **19**, 1437-1444.

Bosman D. K., Deutz N. E., De Graaf A. A., vd Hulst R. W., Van Eijk H. M., Bovee W. M., Maas M. A., Jorning G. G., et Chamuleau R. A. (1990). Changes in brain metabolism during hyperammonemia and acute liver failure: results of a comparative ¹H-NMR spectroscopy and biochemical investigation. *Hepatology* **12**, 281-290.

Bosman D. K., Deutz N. E., Maas M. A., Van Eijk H. M., Smit J. J., de Haan J. G., et Chamuleau R. A. (1992). Amino acid release from cerebral cortex in experimental acute liver failure, studied by in vivo cerebral cortex microdialysis. *J Neurochem* **59**, 591-599.

Bottcher T., Goigny M., Bering J., Domhof S., Nau R., et Ungerstedt U. (2003). Regional differences in glutamine synthetase inhibition by L-methionine sulfoximine: a microdialysis study in the rabbit brain. *Exp Brain Res* **150**, 194-200.

Bromberg P. A., Robin E. D., et Forkner C. E., Jr. (1960). The existence of ammonia in blood in vivo with observations on the significance of the NH₄ plus minus NH₃ system. *J Clin Invest* **39**, 332-341.

Bury-Mone S., Skouloubris S., Dauga C., Thiberge J. M., Dailidienne D., Berg D. E., Labigne A., et De Reuse H. (2003). Presence of active aliphatic amidases in *Helicobacter* species able to colonize the stomach. *Infect Immun* **71**, 5613-5622.

Butterworth R. F. (1998a). Alterations of neurotransmitter-related gene expression in human and experimental portal-systemic encephalopathy. *Metab Brain Dis* **13**, 337-349.

Butterworth R. F. (1998b). Effects of hyperammonaemia on brain function. *J Inherit Metab Dis* **21 Suppl 1**, 6-20.

- Butterworth R. F. (2002). Glutamate transporters in hyperammonemia. *Neurochem Int* **41**, 81-85.
- Butterworth R. F. (2003). Pathogenesis of hepatic encephalopathy: new insights from neuroimaging and molecular studies. *J Hepatol* **39**, 278-285.
- Butterworth R. F., Giguere J. F., Michaud J., Lavoie J., et Layrargues G. P. (1987). Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochem Pathol* **6**, 1-12.
- Canalese J., Gimson A. E., Davis C., Mellon P. J., Davis M., et Williams R. (1982). Controlled trial of dexamethasone and mannitol for the cerebral oedema of fulminant hepatic failure. *Gut* **23**, 625-629.
- Castells A., Salmeron J. M., Navasa M., Rimola A., Salo J., Andreu H., Mas A., et Rodes J. (1993). Liver transplantation for acute liver failure: analysis of applicability. *Gastroenterology* **105**, 532-538.
- Chan H. et Butterworth R. F. (1999). Evidence for an astrocytic glutamate transporter deficit in hepatic encephalopathy. *Neurochem Res* **24**, 1397-1401.
- Chan H., Hazell A. S., Desjardins P., et Butterworth R. F. (2000). Effects of ammonia on glutamate transporter (GLAST) protein and mRNA in cultured rat cortical astrocytes. *Neurochem Int* **37**, 243-248.
- Chatauret N., Rose C., Therrien G., et Butterworth R. F. (2001). Mild hypothermia prevents cerebral edema and CSF lactate accumulation in acute liver failure. *Metab Brain Dis* **16**, 95-102.
- Chatauret N., Zwingmann C., Rose C., Leibfritz D., et Butterworth R. F. (2003). Effects of hypothermia on brain glucose metabolism in acute liver failure: a H/C-nuclear magnetic resonance study. *Gastroenterology* **125**, 815-824.

Chung C., Gottstein J., et Blei A. T. (2001). Indomethacin prevents the development of experimental ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology* **34**, 249-254.

Clark J. B. (1998). N-acetyl aspartate: a marker for neuronal loss or mitochondrial dysfunction. *Dev Neurosci* **20**, 271-276.

Clark W. G. et Cumby H. R. (1975). The antipyretic effect of indomethacin. *J Physiol* **248**, 625-638.

Clemmesen J. O., Hansen B. A., et Larsen F. S. (1997). Indomethacin normalizes intracranial pressure in acute liver failure: a twenty-three-year-old woman treated with indomethacin. *Hepatology* **26**, 1423-1425.

Clemmesen J. O., Kondrup J., et Ott P. (2000). Splanchnic and leg exchange of amino acids and ammonia in acute liver failure. *Gastroenterology* **118**, 1131-1139.

Clemmesen J. O., Larsen F. S., Kondrup J., Hansen B. A., et Ott P. (1999). Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology* **29**, 648-653.

Clifton G. L. (2004). Is keeping cool still hot? An update on hypothermia in brain injury. *Curr Opin Crit Care* **10**, 116-119.

Colombo J. P., Bachmann C., Peheim E., et Beruter J. (1977). Enzymes of ammonia detoxication after portacaval shunt in the rat. II. Enzymes of glutamate metabolism. *Enzyme* **22**, 399-406.

Conti F., Barbaresi P., Melone M., et Ducati A. (1999). Neuronal and glial localization of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in the human cerebral cortex. *Cereb Cortex* **9**, 110-120.

Conti F., DeBiasi S., Minelli A., et Melone M. (1996). Expression of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in cortical astrocytes. *Glia* **17**, 254-258.

- Cooper A. J. et Lai J. C. (1987). Cerebral ammonia metabolism in normal and hyperammonemic rats. *Neurochem Pathol* **6**, 67-95.
- Cooper A. J., McDonald J. M., Gelbard A. S., Gledhill R. F., et Duffy T. E. (1979). The metabolic fate of ^{13}N -labeled ammonia in rat brain. *J Biol Chem* **254**, 4982-4992.
- Cooper A. J., Mora S. N., Cruz N. F., et Gelbard A. S. (1985). Cerebral ammonia metabolism in hyperammonemic rats. *J Neurochem* **44**, 1716-1723.
- Cooper A. J. et Plum F. (1987). Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol Rev* **67**, 440-519.
- Cordoba J. (1996). Glutamine, myo-inositol, and brain edema in acute liver failure. *Hepatology* **23**, 1291-1292.
- Cordoba J. et Blei A. T. (1996). Brain edema and hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* **16**, 271-280.
- Cordoba J., Crespin J., Gottstein J., et Blei A. T. (1999). Mild hypothermia modifies ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Gastroenterology* **116**, 686-693.
- Danbolt N. C. (2001). Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* **65**, 1-105.
- De Graaf A. A., Deutz N. E., Bosman D. K., Chamuleau R. A., de Haan J. G., et Bovee W. M. (1991). The use of in vivo proton NMR to study the effects of hyperammonemia in the rat cerebral cortex. *NMR Biomed* **4**, 31-37.
- de Kneegt R. J., Groeneweg M., Schalm S. W., et Hekking-Weijma I. (1994a). Encephalopathy from acute liver failure and from acute hyperammonemia in the rabbit. A clinical and biochemical study. *Liver* **14**, 25-31.

de Kneegt R. J., Kornhuber J., Schalm S. W., Rusche K., Riederer P., et Tan J. (1993). Binding of the ligand [3H]MK-801 to the MK-801 binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor during experimental encephalopathy from acute liver failure and from acute hyperammonemia in the rabbit. *Metab Brain Dis* **8**, 81-94.

de Kneegt R. J., Schalm S. W., van der Rijt C. C., Fekkes D., Dalm E., et Hekking-Weyma I. (1994b). Extracellular brain glutamate during acute liver failure and during acute hyperammonemia simulating acute liver failure: an experimental study based on in vivo brain dialysis. *J Hepatol* **20**, 19-26.

Dejong C. H., Deutz N. E., et Soeters P. B. (1996). Ammonia and glutamine metabolism during liver insufficiency: the role of kidney and brain in interorgan nitrogen exchange. *Scand J Gastroenterol Suppl* **218**, 61-77.

Dejong C. H., Kampman M. T., Deutz N. E., et Soeters P. B. (1992). Altered glutamine metabolism in rat portal drained viscera and hindquarter during hyperammonemia. *Gastroenterology* **102**, 936-948.

Desjardins P. et Butterworth R. F. (2002). The "peripheral-type" benzodiazepine (omega 3) receptor in hyperammonemic disorders. *Neurochem Int* **41**, 109-114.

Desjardins P., Rao K. V., Michalak A., Rose C., et Butterworth R. F. (1999). Effect of portacaval anastomosis on glutamine synthetase protein and gene expression in brain, liver and skeletal muscle. *Metab Brain Dis* **14**, 273-280.

Detre K., Belle S., Beringer K., et Daily O. P. (1994). Liver transplantation for fulminant hepatic failure in the United States: October 1987 through December 1991. *Clin Transplant* **8**, 274-280.

Deutz N. E., Chamuleau R. A., De Graaf A. A., Bovee W. M., et de Beer R. (1988). In vivo 31P NMR spectroscopy of the rat cerebral cortex during acute hepatic encephalopathy. *NMR Biomed* **1**, 101-106.

- Deutz N. E., Dejong C. H. C., and Soeters P. B. (1996) Interorgan ammonia and glutamine exchange during liver failure, in *Advances in hepatic encephalopathy & metabolism in liver disease* (Record C. and Al-Mardini H., eds.), pp. 87-99. Ipswich Book Company, Newcastle.
- Dienst S. G. (1961). An ion exchange method for plasma ammonia concentration. *J Lab Clin Med* **58**, 149-155.
- Ede R. J., Gimson A. E., Bihari D., et Williams R. (1986). Controlled hyperventilation in the prevention of cerebral oedema in fulminant hepatic failure. *J Hepatol* **2**, 43-51.
- Ede R. J., Gove C. D., Hughes R. D., Marshall W., et Williams R. (1987). Reduced brain Na⁺, K⁺-ATPase activity in rats with galactosamine-induced hepatic failure: relationship to encephalopathy and cerebral oedema. *Clin Sci (Lond)* **72**, 365-371.
- Eguchi S., Kamlot A., Ljubimova J., Hewitt W. R., Lebow L. T., Demetriou A. A., et Rozga J. (1996). Fulminant hepatic failure in rats: survival and effect on blood chemistry and liver regeneration. *Hepatology* **24**, 1452-1459.
- Ellis A. et Wendon J. (1996). Circulatory, respiratory, cerebral, and renal derangements in acute liver failure: pathophysiology and management. *Semin Liver Dis* **16**, 379-388.
- Ellis A. J., Wendon J. A., et Williams R. (2000). Subclinical seizure activity and prophylactic phenytoin infusion in acute liver failure: a controlled clinical trial. *Hepatology* **32**, 536-541.
- Enerson B. E. et Drewes L. R. (2003). Molecular features, regulation, and function of monocarboxylate transporters: implications for drug delivery. *J Pharm Sci* **92**, 1531-1544.
- Enna S. J. (2001). A GABA(B) mystery: the search for pharmacologically distinct GABA(B) receptors. *Mol Interv* **1**, 208-218.

- Faff-Michalak L. et Albrecht J. (1993). The two catalytic components of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in rat cerebral synaptic and nonsynaptic mitochondria: comparison of the response to in vitro treatment with ammonia, hyperammonemia, and hepatic encephalopathy. *Neurochem Res* **18**, 119-123.
- Fan P., Lavoie J., Le N. L., Szerb J. C., et Butterworth R. F. (1990). Neurochemical and electrophysiological studies on the inhibitory effect of ammonium ions on synaptic transmission in slices of rat hippocampus: evidence for a postsynaptic action. *Neuroscience* **37**, 327-334.
- Farmer D. G., Anselmo D. M., Ghobrial R. M., Yersiz H., McDiarmid S. V., Cao C., Weaver M., Figueroa J., Khan K., Vargas J., Saab S., Han S., Durazo F., Goldstein L., Holt C., et Busuttil R. W. (2003). Liver transplantation for fulminant hepatic failure: experience with more than 200 patients over a 17-year period. *Ann Surg* **237**, 666-675.
- Farooque M., Hillered L., Holtz A., et Olsson Y. (1996). Effects of methylprednisolone on extracellular lactic acidosis and amino acids after severe compression injury of rat spinal cord. *J Neurochem* **66**, 1125-1130.
- Feldberg W. et Saxena P. N. (1975). Prostaglandins, endotoxin and lipid A on body temperature in rats. *J Physiol* **249**, 601-615.
- Filippini F., Boggi U., Meacci L., Burchielli S., Vistoli F., Bellini R., Prota C., Colizzi L., Kusmic C., Campani D., Gneri C., Trivella M. G., et Mosca F. (1999). A new technique for total hepatectomy in the pig for testing liver support devices. *Surgery* **125**, 448-455.
- Fine A. (1985). The effects of ammonia infusion on ammonia and glutamine metabolism by liver and muscle in the normal dog. *Contrib Nephrol* **47**, 1-8.

Fiorucci S., Antonelli E., Distrutti E., Mencarelli A., Farneti S., Del Soldato P., et Morelli A. (2004). Liver delivery of NO by NCX-1000 protects against acute liver failure and mitochondrial dysfunction induced by APAP in mice. *Br J Pharmacol* **143**, 33-42.

Fitzpatrick S. M., Hetherington H. P., Behar K. L., et Shulman R. G. (1989). Effects of acute hyperammonemia on cerebral amino acid metabolism and pHi in vivo, measured by ¹H and ³¹P nuclear magnetic resonance. *J Neurochem* **52**, 741-749.

Flock E. V., Tyce G. M., et Owen C. A., Jr. (1966). Utilization of [U-¹⁴C]glucose in brain after total hepatectomy in the rat. *J Neurochem* **13**, 1389-1406.

Francavilla A., Makowka L., Polimeno L., Barone M., Demetris J., Prelich J., Van Thiel D. H., et Starzl T. E. (1989). A dog model for acetaminophen-induced fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* **96**, 470-478.

Friolet R., Colombo J. P., Lazeyras F., Aue W. P., Kretschmer R., Zimmermann A., et Bachmann C. (1989). In vivo ³¹P NMR spectroscopy of energy rich phosphates in the brain of the hyperammonemic rat. *Biochem Biophys Res Commun* **159**, 815-820.

Funovics J. M. et Fischer J. E. (1978). Brain energy metabolism and alterations of transmitter profiles in acute hepatic coma. *J Neural Transm Suppl* 61-67.

Ganda O. P. et Ruderman N. B. (1976). Muscle nitrogen metabolism in chronic hepatic insufficiency. *Metabolism* **25**, 427-435.

Gerhart D. Z., LeVasseur R. J., Broderius M. A., et Drewes L. R. (1989). Glucose transporter localization in brain using light and electron immunocytochemistry. *J Neurosci Res* **22**, 464-472.

Girard G. et Butterworth R. F. (1992). Effect of portacaval anastomosis on glutamine synthetase activities in liver, brain, and skeletal muscle. *Dig Dis Sci* **37**, 1121-1126.

- Girard G., Giguere J. F., et Butterworth R. F. (1993). Region-selective reductions in activities of glutamine synthetase in rat brain following portacaval anastomosis. *Metab Brain Dis* **8**, 207-215.
- Gitlin N., Lewis D. C., et Hinkley L. (1986). The diagnosis and prevalence of subclinical hepatic encephalopathy in apparently healthy, ambulant, non-shunted patients with cirrhosis. *J Hepatol* **3**, 75-82.
- Gove C. D., Hughes R. D., Ede R. J., et Williams R. (1997). Regional cerebral edema and chloride space in galactosamine-induced liver failure in rats. *Hepatology* **25**, 295-301.
- Gregorios J. B., Mozes L. W., Norenberg L. O., et Norenberg M. D. (1985). Morphologic effects of ammonia on primary astrocyte cultures. I. Light microscopic studies. *J Neuropathol Exp Neurol* **44**, 397-403.
- Grisar T., Frere J. M., et Franck G. (1979). Effect of K⁺ ions on kinetic properties of the (Na⁺, K⁺)-ATPase (EC 3.6.1.3) of bulk isolated glial cells, perikarya and synaptosomes from rabbit brain cortex. *Brain Res* **165**, 87-103.
- Hamberger A., Lindroth P., et Nystrom B. (1982). Regulation of glutamate biosynthesis and release in vitro by low levels of ammonium ions. *Brain Res* **237**, 339-350.
- Haussinger D. (1986). Regulation of hepatic ammonia metabolism: the intercellular glutamine cycle. *Adv Enzyme Regul* **25**, 159-180.
- Haussinger D. (1996). Regulation and functional significance of liver cell volume. *Prog Liver Dis* **14**, 29-53.
- Hawkins R. A., Miller A. L., Nielsen R. C., et Veech R. L. (1973). The acute action of ammonia on rat brain metabolism in vivo. *Biochem J* **134**, 1001-1008.

Hermenegildo C., Marcaida G., Montoliu C., Grisolia S., Minana M. D., et Felipo V. (1996). NMDA receptor antagonists prevent acute ammonia toxicity in mice. *Neurochem Res* **21**, 1237-1244.

Hilgier W., Zielinska M., Borkowska H. D., Gadamski R., Walski M., Oja S. S., Saransaari P., et Albrecht J. (1999). Changes in the extracellular profiles of neuroactive amino acids in the rat striatum at the asymptomatic stage of hepatic failure. *J Neurosci Res* **56**, 76-84.

Hindfelt B., Plum F., et Duffy T. E. (1977). Effect of acute ammonia intoxication on cerebral metabolism in rats with portacaval shunts. *J Clin Invest* **59**, 386-396.

Hod G., Chaouat M., Haskel Y., Lernau O. Z., Nissan S., et Mayer M. (1982). Ammonia uptake by skeletal muscle in the hyperammonaemic rat. *Eur J Clin Invest* **12**, 445-450.

Holmin T., Agardh C. D., Alinder G., Herlin P., et Hultberg B. (1983). The influence of total hepatectomy on cerebral energy state, ammonia-related amino acids of the brain and plasma amino acids in the rat. *Eur J Clin Invest* **13**, 215-220.

Itzhak Y., Roig-Cantisano A., Dombro R. S., et Norenberg M. D. (1995). Acute liver failure and hyperammonemia increase peripheral-type benzodiazepine receptor binding and pregnenolone synthesis in mouse brain. *Brain Res* **705**, 345-348.

Jalan R. (2003). Intracranial hypertension in acute liver failure: pathophysiological basis of rational management. *Semin Liver Dis* **23**, 271-282.

Jalan R., Damink S. W., Deutz N. E., Lee A., et Hayes P. C. (1999). Moderate hypothermia for uncontrolled intracranial hypertension in acute liver failure. *Lancet* **354**, 1164-1168.

Jalan R., Olde Damink S. W., Deutz N. E., Hayes P. C., et Lee A. (2001). Restoration of cerebral blood flow autoregulation and reactivity to carbon dioxide in acute liver failure by moderate hypothermia. *Hepatology* **34**, 50-54.

Jalan R., Olde Damink S. W., Deutz N. E., Hayes P. C., et Lee A. (2004a). Moderate hypothermia in patients with acute liver failure and uncontrolled intracranial hypertension. *Gastroenterology* **127**, 1338-1346.

Jalan R., Olde Damink S. W., Hayes P. C., Deutz N. E., et Lee A. (2004b). Pathogenesis of intracranial hypertension in acute liver failure: inflammation, ammonia and cerebral blood flow. *J Hepatol* **41**, 613-620.

Jalan R., Pollok A., Shah S. H., Madhavan K., et Simpson K. J. (2002). Liver derived pro-inflammatory cytokines may be important in producing intracranial hypertension in acute liver failure. *J Hepatol* **37**, 536-538.

Jalan R. et Williams R. (2001). The inflammatory basis of intracranial hypertension in acute liver failure. *J Hepatol* **34**, 940-942.

Jensen K., Ohrstrom J., Cold G. E., et Astrup J. (1992). Indomethacin (Confortid) in severe head injury and elevated intracranial pressure (ICP). *Acta Neurochir Suppl (Wien)* **55**, 47-48.

Kalpana K., Ong H. S., Soo K. C., Tan S. Y., et Prema R. J. (1999). An improved model of galactosamine-induced fulminant hepatic failure in the pig. *J Surg Res* **82**, 121-130.

Kanamori K., Ross B. D., Chung J. C., et Kuo E. L. (1996). Severity of hyperammonemic encephalopathy correlates with brain ammonia level and saturation of glutamine synthetase in vivo. *J Neurochem* **67**, 1584-1594.

Kato M., Hughes R. D., Keays R. T., et Williams R. (1992). Electron microscopic study of brain capillaries in cerebral edema from fulminant hepatic failure. *Hepatology* **15**, 1060-1066.

Katunuma N., Okada M., et Nishii Y. (1966). Regulation of the urea cycle and TCA cycle by ammonia. *Adv Enzyme Regul* **4**, 317-336.

- Kawamata T., Katayama Y., Hovda D. A., Yoshino A., et Becker D. P. (1995). Lactate accumulation following concussive brain injury: the role of ionic fluxes induced by excitatory amino acids. *Brain Res* **674**, 196-204.
- Kendall B. E., Kingsley D. P., Leonard J. V., Lingam S., et Oberholzer V. G. (1983). Neurological features and computed tomography of the brain in children with ornithine carbamoyl transferase deficiency. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **46**, 28-34.
- Knecht K., Michalak A., Rose C., Rothstein J. D., et Butterworth R. F. (1997). Decreased glutamate transporter (GLT-1) expression in frontal cortex of rats with acute liver failure. *Neurosci Lett* **229**, 201-203.
- Knudsen G. M., Paulson O. B., et Hertz M. M. (1991). Kinetic analysis of the human blood-brain barrier transport of lactate and its influence by hypercapnia. *J Cereb Blood Flow Metab* **11**, 581-586.
- Kosenko E., Kaminsky Y., Grau E., Minana M. D., Marcaida G., Grisolia S., et Felipo V. (1994). Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. *J Neurochem* **63**, 2172-2178.
- Kvamme E., Torgner I. A., et Roberg B. (2001). Kinetics and localization of brain phosphate activated glutaminase. *J Neurosci Res* **66**, 951-958.
- Lai J. C. et Cooper A. J. (1986). Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *J Neurochem* **47**, 1376-1386.
- Lai J. C. et Cooper A. J. (1991). Neurotoxicity of ammonia and fatty acids: differential inhibition of mitochondrial dehydrogenases by ammonia and fatty acyl coenzyme A derivatives. *Neurochem Res* **16**, 795-803.
- Larsen F. S., Adel H. B., Pott F., Ejlersen E., Secher N. H., Paulson O. B., et Knudsen G. M. (1996). Dissociated cerebral vasoparalysis in acute liver failure. A hypothesis of gradual cerebral hyperaemia. *J Hepatol* **25**, 145-151.

- Larsen F. S., Gottstein J., et Blei A. T. (2001). Cerebral hyperemia and nitric oxide synthase in rats with ammonia-induced brain edema. *J Hepatol* **34**, 548-554.
- Larsen F. S., Knudsen G. M., et Hansen B. A. (1997). Pathophysiological changes in cerebral circulation, oxidative metabolism and blood-brain barrier in patients with acute liver failure. Tailored cerebral oxygen utilization. *J Hepatol* **27**, 231-238.
- Larsen F. S. et Wendon J. (2002). Brain edema in liver failure: basic physiologic principles and management. *Liver Transpl* **8**, 983-989.
- Laureys S., Owen A. M., et Schiff N. D. (2004). Brain function in coma, vegetative state, and related disorders. *Lancet Neurol* **3**, 537-546.
- Lavoie J., Giguere J. F., Layrargues G. P., et Butterworth R. F. (1987). Activities of neuronal and astrocytic marker enzymes in autopsied brain tissue from patients with hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* **2**, 283-290.
- Lee S. H. et Fisher B. (1961). Portacaval shunt in the rat. *Surgery* **50**, 668-672.
- Lee W. J., Hawkins R. A., Vina J. R., et Peterson D. R. (1998). Glutamine transport by the blood-brain barrier: a possible mechanism for nitrogen removal. *Am J Physiol* **274**, C1101-C1107.
- Lempinen M., Soyer T., et Eiseman B. (1973). A new technique for preparing totally hepatectomized pigs. *Surgery* **73**, 463-467.
- Li L. J., Wu Z. W., Xiao D. S., et Sheng J. F. (2004). Changes of gut flora and endotoxin in rats with D-galactosamine-induced acute liver failure. *World J Gastroenterol* **10**, 2087-2090.
- Lin S. et Raabe W. (1985). Ammonia intoxication: effects on cerebral cortex and spinal cord. *J Neurochem* **44**, 1252-1258.

- Lockwood A. H., McDonald J. M., Reiman R. E., Gelbard A. S., Laughlin J. S., Duffy T. E., et Plum F. (1979). The dynamics of ammonia metabolism in man. Effects of liver disease and hyperammonemia. *J Clin Invest* **63**, 449-460.
- Lockwood A. H., Yap E. W., Rhoades H. M., et Wong W. H. (1991a). Altered cerebral blood flow and glucose metabolism in patients with liver disease and minimal encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab* **11**, 331-336.
- Lockwood A. H., Yap E. W., et Wong W. H. (1991b). Cerebral ammonia metabolism in patients with severe liver disease and minimal hepatic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab* **11**, 337-341.
- Lowry O. H. et Passoneau J. V. (1966). Kinetic evidence for multiple binding sites on phosphofructokinase. *J Biol Chem* **241**, 2268-2279.
- Lowry O. H., Passoneau J. V., Hasselberger F. X., et Schulz D. W. (1964). Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J Biol Chem* **239**, 18-30.
- Lux H. D. (1971). Ammonium and chloride extrusion: hyperpolarizing synaptic inhibition in spinal motoneurons. *Science* **173**, 555-557.
- Mans A. M., DeJoseph M. R., et Hawkins R. A. (1994). Metabolic abnormalities and grade of encephalopathy in acute hepatic failure. *J Neurochem* **63**, 1829-1838.
- Marangos P. J., Turkel C. C., Dziewanowska Z. E., et Fox A. W. (1999). Dichloroacetate and cerebral ischaemia therapeutics. *Expert Opin Investig Drugs* **8**, 373-382.
- Marcaida G., Felipo V., Hermenegildo C., Minana M. D., et Grisolia S. (1992). Acute ammonia toxicity is mediated by the NMDA type of glutamate receptors. *FEBS Lett* **296**, 67-68.

Master S., Gottstein J., et Blei A. T. (1999). Cerebral blood flow and the development of ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology* **30**, 876-880.

Matkowskyj K. A., Marrero J. A., Carroll R. E., Danilkovich A. V., Green R. M., et Benya R. V. (1999). Azoxymethane-induced fulminant hepatic failure in C57BL/6J mice: characterization of a new animal model. *Am J Physiol* **277**, G455-G462.

Matsuoka M., Igisu H., Kohriyama K., et Inoue N. (1990). Effects of ammonia on brain energy metabolites--dose-dependent alterations. *J Neurochem* **55**, 354-355.

McCandless D. W. et Schenker S. (1981). Effect of acute ammonia intoxication on energy stores in the cerebral reticular activating system. *Exp Brain Res* **44**, 325-330.

McConnell J. R., Antonson D. L., Ong C. S., Chu W. K., Fox I. J., Heffron T. G., Langnas A. N., et Shaw B. W., Jr. (1995). Proton spectroscopy of brain glutamine in acute liver failure. *Hepatology* **22**, 69-74.

Mckhann G. M. et Tower D. B. (1961). Ammonia toxicity and cerebral oxidative metabolism. *Am J Physiol* **200**, 420-424.

Mei M. H., An W., Zhang B. H., Shao Q., et Gong D. Z. (1993). Hepatic stimulator substance protects against acute liver failure induced by carbon tetrachloride poisoning in mice. *Hepatology* **17**, 638-644.

Michalak A. et Butterworth R. F. (1997). Selective loss of binding sites for the glutamate receptor ligands [3H]kainate and (S)-[3H]5-fluorowillardiine in the brains of rats with acute liver failure. *Hepatology* **25**, 631-635.

Michalak A., Rose C., Butterworth J., et Butterworth R. F. (1996). Neuroactive amino acids and glutamate (NMDA) receptors in frontal cortex of rats with experimental acute liver failure. *Hepatology* **24**, 908-913.

- Miller D. J., Hickman R., Fratter R., Terblanche J., et Saunders S. J. (1976). An animal model of fulminant hepatic failure: a feasibility study. *Gastroenterology* **71**, 109-113.
- Mirza D. F., Mohamed R., Mutimer D. J., et McMaster P. (1995). Timing and candidacy for transplantation in acute liver failure: the European experience. *Liver Transpl Surg* **1**, 182-186.
- Monaghan D. T., Bridges R. J., et Cotman C. W. (1989). The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **29**, 365-402.
- Moroni F., Riggio O., Carla V., Festuccia V., Ghinelli F., Marino I. R., Merli M., Natali L., Pedretti G., Fiaccadori F., et . (1987). Hepatic encephalopathy: lack of changes of gamma-aminobutyric acid content in plasma and cerebrospinal fluid. *Hepatology* **7**, 816-820.
- Munoz S. J., Moritz M. J., Martin P., Jarrell B. E., et Maddrey W. C. (1993). Liver transplantation for fulminant hepatocellular failure. *Transplant Proc* **25**, 1773-1775.
- Murphy N., Auzinger G., Bernel W., et Wendon J. (2004). The effect of hypertonic sodium chloride on intracranial pressure in patients with acute liver failure. *Hepatology* **39**, 464-470.
- Newsome P. N., Plevris J. N., Nelson L. J., et Hayes P. C. (2000). Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation. *Liver Transpl* **6**, 21-31.
- Norenberg M. D. (1988) Hepatic encephalopathy: Studies with astrocytes cultures., in *The Biochemical Pathology of Astrocytes* (Alan R.Liss., ed.), pp. 451-464. New York.
- Norenberg M. D. (1998). Astroglial dysfunction in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* **13**, 319-335.

- Norenberg M. D. et Bender A. S. (1994). Astrocyte swelling in liver failure: role of glutamine and benzodiazepines. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* **60**, 24-27.
- Norenberg M. D., Huo Z., Neary J. T., et Roig-Cantesano A. (1997). The glial glutamate transporter in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: relation to energy metabolism and glutamatergic neurotransmission. *Glia* **21**, 124-133.
- Norenberg M. D. et Martinez-Hernandez A. (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* **161**, 303-310.
- Nyberg S. L., Cerra F. B., et Gruetter R. (1998). Brain lactate by magnetic resonance spectroscopy during fulminant hepatic failure in the dog. *Liver Transpl Surg* **4**, 158-165.
- Nyberg S. L., Mann H. J., Hu M. Y., Payne W. D., Hu W. S., Cerra F. B., et Rempel R. P. (1996). Extrahepatic metabolism of 4-methylumbelliferone and lidocaine in the anhepatic rabbit. *Drug Metab Dispos* **24**, 643-648.
- Okada T., Watanabe Y., Brusilow S. W., Traystman R. J., et Koehler R. C. (2000). Interaction of glutamine and arginine on cerebrovascular reactivity to hypercapnia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**, H1577-H1584.
- Olafsson S., Gottstein J., et Blei A. T. (1995). Brain edema and intracranial hypertension in rats after total hepatectomy. *Gastroenterology* **108**, 1097-1103.
- Olasmaa M., Rothstein J. D., Guidotti A., Weber R. J., Paul S. M., Spector S., Zeneroli M. L., Baraldi M., et Costa E. (1990). Endogenous benzodiazepine receptor ligands in human and animal hepatic encephalopathy. *J Neurochem* **55**, 2015-2023.
- Olde Damink S. W., Deutz N. E., Dejong C. H., Soeters P. B., et Jalan R. (2002a). Interorgan ammonia metabolism in liver failure. *Neurochem Int* **41**, 177-188.
- Olde Damink S. W., Jalan R., Redhead D. N., Hayes P. C., Deutz N. E., et Soeters P. B. (2002b). Interorgan ammonia and amino acid metabolism in metabolically stable patients with cirrhosis and a TIPSS. *Hepatology* **36**, 1163-1171.

- Pardridge W. M., Connor J. D., et Crawford I. L. (1975). Permeability changes in the blood-brain barrier: causes and consequences. *CRC Crit Rev Toxicol* **3**, 159-199.
- Peeling J., Shoemaker L., Gauthier T., Benarroch A., Sutherland G. R., et Minuk G. Y. (1993). Cerebral metabolic and histological effects of thioacetamide-induced liver failure. *Am J Physiol* **265**, G572-G578.
- Peignoux M., Bernuau J., et Benhamou J. P. (1982). Total hepatectomy and hepatic vascular exclusion in the rat: a comparison, with special reference to the influence of body temperature. *Clin Sci (Lond)* **62**, 273-277.
- Pellerin L. et Magistretti P. J. (1996). Excitatory amino acids stimulate aerobic glycolysis in astrocytes via an activation of the Na⁺/K⁺ ATPase. *Dev Neurosci* **18**, 336-342.
- Petito C. K., Kraig R. P., et Pulsinelli W. A. (1987). Light and electron microscopic evaluation of hydrogen ion-induced brain necrosis. *J Cereb Blood Flow Metab* **7**, 625-632.
- Pfeuffer J., Tkac I., et Gruetter R. (2000). Extracellular-intracellular distribution of glucose and lactate in the rat brain assessed noninvasively by diffusion-weighted ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**, 736-746.
- Plesnila N., Haberstock J., Peters J., Kolbl I., Baethmann A., et Staub F. (1999). Effect of lactacidosis on cell volume and intracellular pH of astrocytes. *J Neurotrauma* **16**, 831-841.
- Pope A. (1978) Neuroglia quantitative aspects, in *Dynamic Properties of Glial Cells* (Schoffeniels E., Franck G., Hertz L., and Tower D. B., eds.), pp. 13-20. Pergamon Press, London, England.
- Posner J. B. et Plum F. (1967). Independence of blood and cerebrospinal fluid lactate. *Arch Neurol* **16**, 492-496.

- Prior R. L. et Visek W. J. (1972). Effects of urea hydrolysis on tissue metabolite concentrations in rats. *Am J Physiol* **223**, 1143-1149.
- Raabe W. (1987) Neurophysiology of ammonia intoxication., in *Hepatic Encephalopathy: Pathophysiology and Treatment*. (Butterworth R. F. and Pomier-Layrargues G., eds.), pp. 49-77. Humana Press, Clifton, NJ.
- Raabe W. (1990). Effects of NH_4^+ on reflexes in cat spinal cord. *J Neurophysiol* **64**, 565-574.
- Raabe W. et Lin S. (1983). Ammonia intoxication and hyperpolarizing postsynaptic inhibition. *Exp Neurol* **82**, 711-715.
- Rahman T. M., Selden C., Khalil M., Diakanov I., et Hodgson H. J. (2004). Alginate-encapsulated human hepatoblastoma cells in an extracorporeal perfusion system improve some systemic parameters of liver failure in a xenogeneic model. *Artif Organs* **28**, 476-482.
- Raichle M. E. et Larson K. B. (1981). The significance of the $\text{NH}_3\text{-NH}_4^+$ equilibrium on the passage of ^{13}N -ammonia from blood to brain. A new regional residue detection model. *Circ Res* **48**, 913-937.
- Rama Rao K. V., Jayakumar A. R., et Norenberg M. D. (2005). Differential response of glutamine in cultured neurons and astrocytes. *J Neurosci Res* **79**, 193-199.
- Rao V. L., Audet R. M., et Butterworth R. F. (1995). Selective alterations of extracellular brain amino acids in relation to function in experimental portal-systemic encephalopathy: results of an in vivo microdialysis study. *J Neurochem* **65**, 1221-1228.
- Rao V. L. et Murthy C. R. (1992). Ammonia-induced alterations in the metabolism of glutamate and aspartate in neuronal perikarya and synaptosomes of rat cerebellum. *Metab Brain Dis* **7**, 51-61.

Ratnakumari L. et Murthy C. R. (1989). Activities of pyruvate dehydrogenase, enzymes of citric acid cycle, and aminotransferases in the subcellular fractions of cerebral cortex in normal and hyperammonemic rats. *Neurochem Res* **14**, 221-228.

Ratnakumari L. et Murthy C. R. (1992). In vitro and in vivo effects of ammonia on glucose metabolism in the astrocytes of rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* **148**, 85-88.

Ratnakumari L. et Murthy C. R. (1993). Response of rat cerebral glycolytic enzymes to hyperammonemic states. *Neurosci Lett* **161**, 37-40.

Ratnakumari L., Subbalakshmi G. Y., et Murthy C. R. (1985). Cerebral citric acid cycle enzymes in methionine sulfoximine toxicity. *J Neurosci Res* **14**, 449-459.

Record C. O., Buxton B., Chase R. A., Curzon G., Murray-Lyon I. M., et Williams R. (1976). Plasma and brain amino acids in fulminant hepatic failure and their relationship to hepatic encephalopathy. *Eur J Clin Invest* **6**, 387-394.

Ringe B., Lubbe N., Kuse E., Frei U., et Pichlmayr R. (1993). Total hepatectomy and liver transplantation as two-stage procedure. *Ann Surg* **218**, 3-9.

Ringel F., Chang R. C., Staub F., Baethmann A., et Plesnila N. (2000). Contribution of anion transporters to the acidosis-induced swelling and intracellular acidification of glial cells. *J Neurochem* **75**, 125-132.

Rolando N., Wade J., Davalos M., Wendon J., Philpott-Howard J., et Williams R. (2000). The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology* **32**, 734-739.

Rosado A., Flores G., Mora J., et Soberon G. (1962). Distribution of an ammonia load in the normal rat. *Am J Physiol* **203**, 37-42.

Rose C. (2002). Increased extracellular brain glutamate in acute liver failure: decreased uptake or increased release? *Metab Brain Dis* **17**, 251-261.

Rose C., Michalak A., Pannunzio M., Chatauret N., Rambaldi A., et Butterworth R. F. (2000). Mild hypothermia delays the onset of coma and prevents brain edema and extracellular brain glutamate accumulation in rats with acute liver failure. *Hepatology* **31**, 872-877.

Rose C., Michalak A., Rao K. V., Quack G., Kircheis G., et Butterworth R. F. (1999). L-ornithine-L-aspartate lowers plasma and cerebrospinal fluid ammonia and prevents brain edema in rats with acute liver failure. *Hepatology* **30**, 636-640.

Rothstein J. D., Patel S., Regan M. R., Haenggeli C., Huang Y. H., Bergles D. E., Jin L., Dykes H. M., Vidensky S., Chung D. S., Toan S. V., Bruijn L. I., Su Z. Z., Gupta P., et Fisher P. B. (2005). Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* **433**, 73-77.

Rovira A., Cordoba J., Ragner N., et Alonso J. (2002). Magnetic resonance imaging measurement of brain edema in patients with liver disease: resolution after transplantation. *Curr Opin Neurol* **15**, 731-737.

Rudolph U., Crestani F., et Mohler H. (2001). GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 188-194.

Schafer D. F. et Jones E. A. (1982). Hepatic encephalopathy and the gamma-aminobutyric-acid neurotransmitter system. *Lancet* **1**, 18-20.

Schliess F., Gorg B., Fischer R., Desjardins P., Bidmon H. J., Herrmann A., Butterworth R. F., Zilles K., et Haussinger D. (2002). Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *FASEB J* **16**, 739-741.

Schmidt W., Wolf G., Grungriff K., Meier M., et Reum T. (1990). Hepatic encephalopathy influences high-affinity uptake of transmitter glutamate and aspartate into the hippocampal formation. *Metab Brain Dis* **5**, 19-31.

- Schneider F., Lutun P., Boudjema K., Wolf P., et Tempe J. D. (1994). In vivo evidence of enhanced guanylyl cyclase activation during the hyperdynamic circulation of acute liver failure. *Hepatology* **19**, 38-44.
- Schousboe A., Sarup A., Larsson O. M., et White H. S. (2004). GABA transporters as drug targets for modulation of GABAergic activity. *Biochem Pharmacol* **68**, 1557-1563.
- Schumacher M. et McEwen B. S. (1989). Steroid and barbiturate modulation of the GABA_A receptor. Possible mechanisms. *Mol Neurobiol* **3**, 275-304.
- Seda H. W., Hughes R. D., Gove C. D., et Williams R. (1984). Inhibition of rat brain Na⁺,K⁺-ATPase activity by serum from patients with fulminant hepatic failure. *Hepatology* **4**, 74-79.
- Sibson N. R., Dhankhar A., Mason G. F., Behar K. L., Rothman D. L., et Shulman R. G. (1997). In vivo ¹³C NMR measurements of cerebral glutamine synthesis as evidence for glutamate-glutamine cycling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2699-2704.
- Sibson N. R., Mason G. F., Shen J., Cline G. W., Herskovits A. Z., Wall J. E., Behar K. L., Rothman D. L., et Shulman R. G. (2001). In vivo (¹³C) NMR measurement of neurotransmitter glutamate cycling, anaplerosis and TCA cycle flux in rat brain during. *J Neurochem* **76**, 975-989.
- Sklar G. E. et Subramaniam M. (2004). Acetylcysteine treatment for non-acetaminophen-induced acute liver failure. *Ann Pharmacother* **38**, 498-500.
- Staub F., Baethmann A., Peters J., Weigt H., et Kempfski O. (1990). Effects of lactacidosis on glial cell volume and viability. *J Cereb Blood Flow Metab* **10**, 866-876.
- Strauss G., Hansen B. A., Knudsen G. M., et Larsen F. S. (1998). Hyperventilation restores cerebral blood flow autoregulation in patients with acute liver failure. *J Hepatol* **28**, 199-203.

- Strauss G. I., Hogh P., Moller K., Knudsen G. M., Hansen B. A., et Larsen F. S. (1999). Regional cerebral blood flow during mechanical hyperventilation in patients with fulminant hepatic failure. *Hepatology* **30**, 1368-1373.
- Strauss G. I., Knudsen G. M., Kondrup J., Moller K., et Larsen F. S. (2001). Cerebral metabolism of ammonia and amino acids in patients with fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* **121**, 1109-1119.
- Sugden P. H. et Newsholme E. A. (1975). The effects of ammonium, inorganic phosphate and potassium ions on the activity of phosphofructokinases from muscle and nervous tissues of vertebrates and invertebrates. *Biochem J* **150**, 113-122.
- Swain M., Butterworth R. F., et Blei A. T. (1992a). Ammonia and related amino acids in the pathogenesis of brain edema in acute ischemic liver failure in rats. *Hepatology* **15**, 449-453.
- Swain M. S., Bergeron M., Audet R., Blei A. T., et Butterworth R. F. (1992b). Monitoring of neurotransmitter amino acids by means of an indwelling cisterna magna catheter: a comparison of two rodent models of fulminant liver failure. *Hepatology* **16**, 1028-1035.
- Szerb J. C. et Butterworth R. F. (1992). Effect of ammonium ions on synaptic transmission in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* **39**, 135-153.
- Takagaki G., Hiranos S., et Tsukada Y. (1957). Endogenous respiration and ammonia formation in brain slices. *Arch Biochem Biophys* **68**, 196-205.
- Takahashi H., Koehler R. C., Brusilow S. W., et Traystman R. J. (1991). Inhibition of brain glutamine accumulation prevents cerebral edema in hyperammonemic rats. *Am J Physiol* **261**, H825-H829.
- Takahashi K., Kameda H., Kataoka M., Sanjou K., Harata N., et Akaike N. (1993). Ammonia potentiates GABAA response in dissociated rat cortical neurons. *Neurosci Lett* **151**, 51-54.

Taniguchi M., Takeuchi T., Nakatsuka R., Watanabe T., et Sato K. (2004). Molecular process in acute liver injury and regeneration induced by carbon tetrachloride. *Life Sci* **75**, 1539-1549.

Terjung R. L., Dudley G. A., et Meyer R. A. (1985). Metabolic and circulatory limitations to muscular performance at the organ level. *J Exp Biol* **115**, 307-318.

Theoret Y. et Bossu J. L. (1985). Effects of ammonium salts on synaptic transmission to hippocampal CA1 and CA3 pyramidal cells in vivo. *Neuroscience* **14**, 807-821.

Theoret Y., Davies M. F., Esplin B., et Capek R. (1985). Effects of ammonium chloride on synaptic transmission in the rat hippocampal slice. *Neuroscience* **14**, 798-806.

Therrien G., Giguere J. F., et Butterworth R. F. (1991). Increased cerebrospinal fluid lactate reflects deterioration of neurological status in experimental portal-systemic encephalopathy. *Metab Brain Dis* **6**, 225-231.

Tissari A. H., Schonhofer P. S., Bogdanski D. F., et Brodie B. B. (1969). Mechanism of biogenic amine transport. II. Relationship between sodium and the mechanism of ouabain blockade of the accumulation of serotonin and norepinephrine by synaptosomes. *Mol Pharmacol* **5**, 593-604.

Tofteng F., Jorgensen L., Hansen B. A., Ott P., Kondrup J., et Larsen F. S. (2002). Cerebral microdialysis in patients with fulminant hepatic failure. *Hepatology* **36**, 1333-1340.

Tofteng F. et Larsen F. S. (2002). Monitoring extracellular concentrations of lactate, glutamate, and glycerol by in vivo microdialysis in the brain during liver transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl* **8**, 302-305.

Tofteng F. et Larsen F. S. (2004). The effect of indomethacin on intracranial pressure, cerebral perfusion and extracellular lactate and glutamate concentrations in patients with fulminant hepatic failure. *J Cereb Blood Flow Metab* **24**, 798-804.

Tonnesen K. (1977). Experimental liver failure. A comparison between hepatectomy and hepatic devascularization in the pig. *Acta Chir Scand* **143**, 271-277.

Traber P., DalCanto M., Ganger D., et Blei A. T. (1989). Effect of body temperature on brain edema and encephalopathy in the rat after hepatic devascularization. *Gastroenterology* **96**, 885-891.

Traber P. G., Dal Canto M., Ganger D. R., et Blei A. T. (1987). Electron microscopic evaluation of brain edema in rabbits with galactosamine-induced fulminant hepatic failure: ultrastructure and integrity of the blood-brain barrier. *Hepatology* **7**, 1272-1277.

Tsacopoulos M., Poitry-Yamate C. L., Poitry S., Perrottet P., et Veuthey A. L. (1997). The nutritive function of glia is regulated by signals released by neurons. *Glia* **21**, 84-91.

Tyce G. M., Flock E. V., et Owen C. A. (1971). Metabolism of glucose in brain after hepatectomy. *Exp Biol Med* **4**, 92-103.

Tyce G. M., Ogg J., et Owen C. A., Jr. (1981). Metabolism of acetate to amino acids in brains of rats after complete hepatectomy. *J Neurochem* **36**, 640-650.

Tyor M. P., Owen E. E., Berry J. N., et Flanagan J. F. (1960). The relative role of extremity, liver, and kidney as ammonia receivers and donors in patients with liver disease. *Gastroenterology* **39**, 420-424.

Ukida M., Morishita H., Morimoto Y., Usui H., and Nagashima H. (1988) Limited glutamine synthesis in brains of dogs with a portacaval anastomosis after ¹⁴N-ammonium chloride loading, in *Advances in Ammonia Metabolism and Hepatic Encephalopathy* (Soeters P. B., Wilson J. H. P., Meijer A. J., and Holm E., eds.), pp. 433-438. Excerta Medica, Amsterdam.

Vaquero J., Chung C., Cahill M. E., et Blei A. T. (2003). Pathogenesis of hepatic encephalopathy in acute liver failure. *Semin Liver Dis* **23**, 259-269.

Vogels B. A., Maas M. A., Daalhuisen J., Quack G., et Chamuleau R. A. (1997). Memantine, a noncompetitive NMDA receptor antagonist improves hyperammonemia-induced encephalopathy and acute hepatic encephalopathy in rats. *Hepatology* **25**, 820-827.

Voorhies T. M., Ehrlich M. E., Duffy T. E., Petito C. K., et Plum F. (1983). Acute hyperammonemia in the young primate: physiologic and neuropathologic correlates. *Pediatr Res* **17**, 970-975.

Wallace D. R. et Dawson R., Jr. (1992). Ammonia regulation of phosphate-activated glutaminase displays regional variation and impairment in the brain of aged rats. *Neurochem Res* **17**, 1113-1122.

Wang C. H., Jawan B., Lee T. H., Hung K. S., Chou W. Y., Lu C. N., Liu J. K., et Chen Y. J. (2004). Single injection of naked plasmid encoding alpha-melanocyte-stimulating hormone protects against thioacetamide-induced acute liver failure in mice. *Biochem Biophys Res Commun* **322**, 153-161.

Warren K. S. et Nathan D. G. (1958). The passage of ammonia across the blood-brain-barrier and its relation to blood pH. *J Clin Invest* **37**, 1724-1728.

Weber F. L., Jr. (1997). Effects of lactulose on nitrogen metabolism. *Scand J Gastroenterol Suppl* **222**, 83-87.

Weber F. L., Jr. et Veach G. L. (1979). The importance of the small intestine in gut ammonium production in the fasting dog. *Gastroenterology* **77**, 235-240.

Webster L. T. et Gabuzda G. J. (1958). Ammonium uptake by the extremities and brain in hepatic coma. *J Clin Invest* **37**, 414-424.

Weil-Malherbe H. et Gordon J. (1971). Amino acid metabolism and ammonia formation in brain slices. *J Neurochem* **18**, 1659-1672.

Wendon J. A., Harrison P. M., Keays R., et Williams R. (1994). Cerebral blood flow and metabolism in fulminant liver failure. *Hepatology* **19**, 1407-1413.

Wolfe R. R., Jahoor F., Herndon D. N., et Miyoshi H. (1991). Isotopic evaluation of the metabolism of pyruvate and related substrates in normal adult volunteers and severely burned children: effect of dichloroacetate and glucose infusion. *Surgery* **110**, 54-67.

Yang S. T. et Chang H. H. (1998). Nitric oxide of neuronal origin mediates NMDA-induced cerebral hyperemia in rats. *Neuroreport* **9**, 415-418.

Yao H., Sadoshima S., Fujii K., Kusuda K., Ishitsuka T., Tamaki K., et Fujishima M. (1987). Cerebrospinal fluid lactate in patients with hepatic encephalopathy. *Eur Neurol* **27**, 182-187.

Ytrebo L. M., Korvald C., Nedredal G. I., Elvenes O. P., Nielsen Grymyr O. J., et Revhaug A. (2001). N-acetylcysteine increases cerebral perfusion pressure in pigs with fulminant hepatic failure. *Crit Care Med* **29**, 1989-1995.

Zaki A. E., Ede R. J., Davis M., et Williams R. (1984). Experimental studies of blood brain barrier permeability in acute hepatic failure. *Hepatology* **4**, 359-363.

Zentek J., Marquart B., et Pietrzak T. (2002). Intestinal effects of mannanoligosaccharides, transgalactooligosaccharides, lactose and lactulose in dogs. *J Nutr* **132**, 1682S-1684S.

Zimmermann C., Ferenci P., Pifl C., Yurdaydin C., Ebner J., Lassmann H., Roth E., et Hortnagl H. (1989). Hepatic encephalopathy in thioacetamide-induced acute liver failure in rats: characterization of an improved model and study of amino acid-ergic neurotransmission. *Hepatology* **9**, 594-601.

Zwingmann C., Chatauret N., Leibfritz D., et Butterworth R. F. (2003). Selective increase of brain lactate synthesis in experimental acute liver failure: results of a [¹H-¹³C] nuclear magnetic resonance study. *Hepatology* **37**, 420-428.