

Université de Montréal

Encéphalopathie hépatique chronique: Étude des neurotransmetteurs et du métabolisme énergétique cérébral en fonction de l'âge.

par

Robert M. Audet

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de médecine

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

Septembre 2000
©Robert M. Audet, 2000



W
4
U58
2001
v. 045

Université de Montréal

Encéphalopathie hépatique chronique: Étude des
neurotransmetteurs et du métabolisme énergétique
cérébral en fonction de l'âge.

par

Fabien M. Aubert

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophie Doctor (Ph.D.)

en Sciences Biomédicales



Septembre 2000
Fabien M. Aubert, 2000

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Encéphalopathie hépatique chronique: Étude des neurotransmetteurs et du métabolisme énergétique cérébral en fonction de l'âge.

présentée par:

Robert M. Audet

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Roger F. Butterworth Ph.D., D.Sc.

Gilles Pomier Layrargues MD.

Pierre Blanchet M.D., Ph.D.

Glen Baker Ph.D.

Thèse acceptée le: _____

SOMMAIRE

L'encéphalopathie hépatique est une complication neuropsychiatrique secondaire à une maladie de foie chronique ou aiguë, on retrouve donc en conséquence une forme chronique et une forme aiguë. L'encéphalopathie découlant d'une atteinte hépatique aiguë évolue rapidement vers le coma en quelques heures ou quelques jours. Cette forme d'encéphalopathie est provoquée par un œdème cérébral important causant une augmentation de la pression intracrânienne et un engagement cérébral le plus souvent mortel. Le sujet de cette thèse porte sur l'encéphalopathie porto-systémique (EPS) qui est la forme chronique de la maladie. Elle se développe lentement par l'apparition de désordres du cycle d'éveil et de sommeil, pouvant progresser vers l'astérisis, la stupeur et le coma.

L'EPS peut apparaître de deux façons, soit parce que l'hypertension portale provoquée par la cirrhose entraîne la formation d'un réseau de vaisseaux collatéraux porto-systémiques ou suite à une dérivation porto-systémique chirurgicale visant à abaisser cette hypertension portale. Dans les deux cas, une partie importante de la circulation portale ne passe plus par le foie et se retrouve dans la circulation systémique. Parmi les toxines venant des intestins et qui ne sont plus retirées de la circulation par le foie, il semble que l'ammoniaque soit l'auteur principal des méfaits associés à l'EPS. Malgré une corrélation assez claire entre les niveaux plasmatiques d'ammoniaque et le degré de l'atteinte neurologique, les mécanismes impliqués restent flous. L'ammoniaque pourrait altérer le fonctionnement de plusieurs systèmes de neurotransmission et interférer également avec le métabolisme énergétique cérébral. Il apparaît que cette atteinte est principalement astrocytaire, car les changements tant histologiques que biochimiques se rencontrent dans ce type

cellulaire.

Des études cliniques récentes ont montré que la prévalence de l'EPS est plus grande chez les patients âgés. Dans le but d'identifier les mécanismes physiopathologiques pouvant conduire à une plus grande vulnérabilité chez les sujets âgés, nous avons procédé à l'étude de certaines composantes du système de neurotransmission glutamatergique, à l'étude des récepteurs aux benzodiazépines de type "périphérique", ainsi qu'à l'utilisation cérébrale du glucose. À cette fin, nous avons utilisé un modèle animal d'EPS très utilisé et bien caractérisé, où chirurgicalement on provoque une dérivation du sang portal vers la circulation systémique (anastomose porto-cave, ou APC) chez des jeunes rats adultes (3 mois) et âgés (24 mois).

D'un point de vue histologique, nous avons observé une astrocytose Alzheimer de type II, la marque distinctive d'une EPS, chez les rats âgés porteurs d'une APC. Suite à une APC nous avons observé des altérations du cycle de d'éveil et de sommeil, caractéristiques de l'EPS, plus significatives chez les rats âgés que chez les jeunes rats adultes.

Nous avons montré que chez le groupe d'animaux âgés ayant une APC, on retrouve une baisse plus étendue de l'utilisation locale du glucose cérébral comparativement au groupe ayant une APC chez les jeunes. De plus, certains changements au niveau des composantes du système de neurotransmission glutamatergique sont significativement plus grands chez les rats âgés ayant une APC.

Nous avons également observé une augmentation marquée des sites de liaison pour les benzodiazépines de type périphérique sur les mitochondries, en fonction de l'âge chez les groupes contrôles. En plus de cet effet purement

relié à l'âge, on retrouve une hausse très importante de ces sites de liaison chez les groupes jeunes et vieux ayant une APC.

Dans notre modèle animal, une augmentation importante des concentrations d'ammoniaque plasmatique a été observée entre les rats ayant subi une APC et les contrôles, qu'ils soient âgés ou jeunes. Par contre aucun effet de l'âge *per se* sur l'ammoniaque plasmatique n'a pu être mis à jour. Ceci suggère que le cerveau vieillissant serait plus vulnérable à une même concentration d'ammoniaque et plus susceptible de développer une EPS.

L'ensemble de ces données renforce la vision selon laquelle l'EH est une atteinte astrocytaire et mitochondriale. En effet, on retrouve une quantité accrue de mitochondries dans les astrocytes Alzheimer de type II et l'utilisation du glucose ainsi que les récepteurs pour les benzodiazépines de type périphérique se retrouvent au niveau de la mitochondrie.

Ces données ont des implications cliniques potentiellement grandes et pourraient influencer le traitement des complications des maladies de foie chroniques en fonction de l'âge du patient. Un suivi plus rigoureux de l'évolution de l'EH devra être envisagé pour les patients âgés par l'usage de tests de dépistage plus sensibles. Le contrôle de la concentration d'ammoniaque plasmatique chez ces patients devra également être plus méthodique, soit par des stratégies de réduction de la production d'ammoniaque ou par des thérapies visant à augmenter son élimination.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	i
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiii
REMERCIEMENTS.....	xvi
DÉDICACE.....	xviii
CHAPITRE 1: REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
1.1 L'ENCÉPHALOPATHIE PORTO-SYSTÉMIQUE	1
1.1.1 Manifestations cliniques.....	2
1.1.2 Effets de l'âge.....	4
1.1.3 L'encéphalopathie porto-systémique est associée à une atteinte astrocytaire	5
1.1.3.1 Physiologie des astrocytes.....	5
1.1.3.2 Histopathologie.....	6
1.1.4 Modèles animaux d'encéphalopathie porto- systémique.....	13
1.1.4.1 Anastomose porto-cave chez le rat.....	13

1.1.4.2	Administration de tétrachlorure de carbone.....	15
1.1.4.3	Obstruction des voies biliaires.....	17
1.1.4.4	Diète contenant des sels d'ammoniaque.....	17
1.2	SUBSTANCES NEUROTOXIQUES PRODUITES LORS DE MALADIES HÉPATIQUES CHRONIQUES.....	18
1.2.1	Liens entre l'accumulation de manganèse et l'encéphalopathie porto-systémique.....	18
1.2.2	Liens entre l'ammoniaque et l'encéphalopathie porto-systémique.....	20
1.2.3	Production et élimination de l'ammoniaque.....	22
1.2.3.1	Élimination par le foie.....	22
1.2.3.2	Élimination par le muscle.....	23
1.2.3.3	Élimination par le rein.....	24
1.2.3.4	Élimination par le cerveau.....	25
1.2.4	Effets directs de l'ammoniaque sur la fonction cérébrale.....	27
1.2.5	Effet de l'ammoniaque sur le métabolisme énergétique.....	28
1.2.5.1	Méthode du ¹⁴ C-Glucose.....	32

1.2.5.2	Méthode du ¹⁴ C-Désoxyglucose.....	33
1.2.5.3	Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire	35
1.2.5.4	Taux d'utilisation d'oxygène cérébral.....	38
1.2.5.5	Flux sanguin cérébral.....	39
1.2.6	Effet de l'ammoniaque sur le système de neurotransmission glutamatergique	39
1.2.6.1	Le cycle glutamate-glutamine.....	42
1.2.6.2	Récepteurs canaux ioniques.....	44
1.2.6.2.1	Récepteurs pour le N-méthyl-D- aspartate (NMDA):	45
1.2.6.2.2	Récepteurs pour l'AMPA et le Kainate.....	49
1.2.6.3	Récepteurs liés aux protéines G.....	50
1.2.6.4	Capture du glutamate.....	52
1.2.6.5	Libération du glutamate	56
1.2.7	Effet de l'ammoniaque sur les récepteurs aux benzodiazépines de type périphérique.....	57
1.3	LE VIEILLISSEMENT NORMAL DU CERVEAU	62
1.3.1	Modifications morphologiques.....	63

1.3.2	Modifications biochimiques et moléculaires.....	66
1.3.2.1	L'hypothèse des radicaux libres.....	67
1.3.2.2	L'hypothèse d'une atteinte membranaire.....	69
1.3.2.3	L'hypothèse de l'oxyde nitrique (NO).....	69
1.3.2.4	Modifications du système glutamatergique.....	70
1.4	BUT DE L'ÉTUDE PROPOSÉE.....	74
1.5	MÉTHODOLOGIE UTILISÉE	75
1.5.1	Anastomose porto-cave.....	75
1.5.2	Mesure des périodes d'activité ambulatoire spontanées	78
1.5.3	Mesure de l'utilisation locale du glucose cérébral.....	80
1.5.4	Histologie	82
1.5.5	Autoradiographie des récepteurs aux benzodiazépines de type périphérique.....	83
1.5.6	Western Blot.....	84
1.5.7	Autoradiographie quantitative des récepteurs glutamatergiques de type AMPA, NMDA et des sites de capture du glutamate	86
1.5.8	Expression du gène GLT1/EAAT2.....	87

1.5.9 Chromatographie liquide sous haute pression.....	89
CHAPITRE 2: RÉSULTATS.....	92
2.1 MODIFICATIONS COMPORTEMENTALES.....	92
2.2.1 Article 1	
Portacaval Anastomosis Results in More Widespread Alterations of Cerebral Metabolism in Old Versus Young Adult Rats: Implications for Post-Shunt Encephalopathy.....	95
2.2.2 Article 2	
Alterations of astrocyte morphology and of "peripheral-type" benzodiazepine receptor sites in brain following portacaval anastomosis: effect of aging.	115
2.2.3 Article 3	
Increased glutamate transporter (GLT-1) sites in brain in old versus young rats following portacaval anastomosis.....	139
CHAPITRE 3: DISCUSSION GÉNÉRALE.....	169
3.1 ASTROCYTOSE ALZHEIMER DE TYPE II.....	169
3.2 UTILISATION LOCALE DU GLUCOSE CÉRÉBRAL.....	173

3.3 RÉCEPTEURS AUX BENZODIAZÉPINES DE TYPE PÉRIPHÉRIQUE	176
3.4 SYSTÈME DE NEUROTRANSMISSION GLUTAMATERGIQUE.....	181
3.4.1 Sites de capture pour le glutamate	181
3.4.2 Sites de liaison pour le ³ H-MK801 et le ³ H-AMPA	187
3.4.3 Acides aminés dans le tissu cortical	189
3.5 PERSPECTIVES CLINIQUES ET PISTES DE RECHERCHES.....	190
3.6 CONCLUSIONS	196
BIBLIOGRAPHIE.....	201

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1: Revue de la littérature

Tableau 1.1	Sommaire des principaux résultats publiés sur l'astrocytose Alzheimer de type II.....	9
-------------	---	---

Chapitre 2: Résultats

Article 1.

Table 2.1	Physiological data of 2- and 24-month old rats four weeks after portacaval anastomosis or sham operation	100
Table 2.2	Local cerebral glucose utilization (LCGU) following portacaval anastomosis in young versus old adult male rats	102

Article 2

Table 2.3	Liver/body weight and blood ammonia concentrations.....	122
Table 2.4	Specific binding of ³ H-PK11195 in 3 month and 25 month-old rats four weeks after portacaval anastomosis	125

Article 3

Table 2.5	Concentrations of amino acids in cortical tissue.....	155
-----------	---	-----

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1: Revue de la littérature

Figure 1.1	Astrocytes Alzheimer de type II	7
Figure 1.2	Relations entre le cycle de Krebs et la navette malate-aspartate.....	30
Figure 1.3	Aperçu des principales composantes d'une synapse glutamatergique.....	41
Figure 1.4	Familles de gènes codant pour les récepteurs glutamatergiques.....	47
Figure 1.5	Schéma de quatre types de récepteurs pour le glutamate.....	48
Figure 1.6	Procédure chirurgicale de l'anastomose porto-cave.....	77

Chapitre 2: Résultats

Figure 2.1	Activité ambulatoire spontanée des rats contrôles et avec une anastomose porto-cave, jeunes et vieux.....	93
------------	---	----

Article 1

Figure 2.2	Representative ^{14}C -2-deoxyglucose autoradiograms.....	103
------------	--	-----

Article 2

Figure 2.3	Representative photomicrographs of astrocytes.....	124
Figure 2.4	Representative ^3H -PK11195 autoradiograms from mid-sagittal sections of brains of young and old adult rats following portacaval anastomosis	126

Figure 2.5	Western blot analysis of glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in cerebral cortex of old adult rats four weeks following portacaval anastomosis.....	127
Figure 2.6	Western blot analysis of glutamine synthetase (GS) expression in cerebral cortex of old adult rats four weeks following portacaval anastomosis	128
 <u>Article 3</u>		
Figure 2.7	Specific binding of D- ³ H-aspartate in frontal cortex	149
Figure 2.8	Western blot analysis of glutamate transporter (GLT-1) expression in cerebral cortex	151
Figure 2.9	Expression of the astrocytic glutamate transporter (GLT-1) mRNA.....	152
Figure 2.10	Specific binding of ³ H-MK801 in frontal cortex.....	153
Figure 2.11	Specific binding of ³ H-AMPA in frontal cortex.....	154

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α -KGDH	Complexe de l' α -cétoglutarate déshydrogénase (EC 1.2.4.2, EC 2.3.1.61, et EC 1.6.4.3)
t-ACPD	Acide 1-aminocyclopentane-trans-1,3-dicarboxylique (agoniste des récepteurs métabotropiques glutamatergique)
ADNmt	ADN mitochondrial
AMPA	Acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolo-propionique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
APC	Anastomose Porto-Cave
ATP	Adénosine Triphosphate
Bmax	Nombre de sites de liaison maximal
cADN	ADN complémentaire (ADN venant de la copie d'ARN messager)
CCl ₄	Tétrachlorure de carbone (hépatotoxine)
CMRO ₂	Taux d'utilisation d'oxygène cérébral
CPP	Acide 3-(2-carboxypiperazin-4-yl) propyl-1-phosphonique (ligand spécifique des sites de liaison du glutamate sur les NMDA)
DAG	diacylglycérol
DBI	inhibiteur de la liaison du diazépam (diazepam binding inhibitor), neuropeptide précurseur de l'ODN, l'EPN et le TTN
EAAC1	Sous type de transporteur pour le glutamate qui s'appelle EAAT3 (excitatory amino acid transporter 3) sous la nouvelle nomenclature
EAAT4	Sous type de transporteur pour le glutamate (excitatory amino acid transporter 4)
EAAT5	Sous type de transporteur pour le glutamate (excitatory amino acid transporter 5)
EH	Encéphalopathie Hépatique
EPN	Eicosapentaneuropeptide, neuropeptide provenant du clivage du DBI
EPS	Encéphalopathie Portosystémique
GABA	Acide gamma amino-butyrique
GFAP	Filaments intermédiaires des astrocytes (Glial Fibrillary Acidic Protein)
GLAST	Sous type de transporteur pour le glutamate qui s'appelle EAAT1 (excitatory amino acid transporter 1) sous la nouvelle

	nomenclature
Gln	Glutamine
GLT1	Sous type de transporteur pour le glutamate qui s'appelle EAAT2 (excitatory amino acid transporter 2) sous la nouvelle nomenclature
Glu	Glutamate
Glx	Spectre combiné du glutamate et de la glutamine en spectroscopie par résonance magnétique nucléaire.
GDH	Glutamate déshydrogénase (EC 1.4.1.2)
GS	Glutamine Synthétase (EC 6.3.1.2)
HCO ₃	Tampon carbonate
¹ H-RMN	Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire des protons
IBP	Protéine de liaison pour les isoquinolines faisant partie des RBTP
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphate
i.v.	Intraveineux
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LTP	potentialisation à long terme
mGluR	Récepteur pour le Glutamate de type Métabotropiques
MSO	L-Méthionine Sulfoximine (inhibiteur de la glutamine synthétase)
NMDA	N-Méthyl-D-Aspartate
NO	Oxyde nitrique
O ₂ •	Superoxyde (radical libre)
ODN	Octodécaneuropeptide, neuropeptide provenant du clivage du DBI
OH•	Anion hydroxyl (radical libre)
ONOO•	Peroxynitrite (radical libre)
PAG	Glutaminase activé par le phosphate (EC 3.5.1.2)
³¹ P-RMN	Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du phosphore ³¹
PCr	Phosphocréatine
PDE	Phospho-diesters
PET	Tomographie par émission de positrons (Positron Emmision Tomography)
Pi	Phosphate inorganique
PI-PLC	Phospholipase C spécifique aux phosphoinositides
PKC	Protéine kinase C

PME	Phospho-monoesters
RBTP	Récepteurs aux benzodiazépines de type périphérique
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
Sham	Groupe contrôle laparotomisé
TIPS	Anastomose porto-cave intrahépatique par voie trans-jugulaire (Transjugular Intrahepatic Portacaval Shunt)
TTN	Triakontatetrapeptide, neuropeptide provenant du clivage du DBI
ULGC	Utilisation Locale du Glucose Cérébral
Vmax	Vitesse maximale de transport

REMERCIEMENTS

J'aimerais exprimer ma plus profonde reconnaissance à mon directeur le Dr. Roger F. Butterworth, pour sa patience, sa compréhension et ses bons conseils. Il a su me donner le goût de la recherche et a permis d'établir un climat de recherche stimulant au sein de l'unité de recherche. Je le remercie pour tous les "voyages de pêche" (au figuré) qu'il m'a permis de faire et espère un jour avoir la chance de prendre du vrai poisson avec lui.

J'aimerais également exprimer ma gratitude à:

La Fondation Canadienne du Foie et à la Faculté des études supérieures pour leur appui financier très apprécié.

Aux membres de mon jury qui ont accepté si généreusement de donner de leur temps à la correction de cette thèse.

À tous les membres de l'Unité de Recherche en Sciences Neurologiques pour leur soutien, leur joie de vivre et leur entrain qui ont su faire en sorte que ces dernières années ont passé si vite. Je pense entre autres à Patricia Bandeira, Mireille Bélanger, Dr. Paul Buu, Helen Chan, Nicolas Chateuret, Dr. Paul Desjardins, Dr. Jean-Pascal de Waele, Dr. Jean-François Giguère, Dr. Alan Hazell, Dr. Kershtin Knecht, Dr. Joël Lavoie, Dr. Dorothy Leong, Dr. Violina Lozeva, Dr. Adrianna Michalak, Mark Pannunzio, Pierre Panunzio, Dr. Raghavendra Rao, Dr. Rama Rao, Dr. Christopher Rose, Dominique Roy, Dr. Guy Therrien, Dr. Kathryn Todd.

À tous les membres du Centre de recherche du CHUM-pavillon Saint-Luc pour leur appui logistique et les innombrables services qu'ils m'ont rendu

J'aimerais manifester tout particulièrement ma reconnaissance à ma conjointe Chantal Brien et mes deux filles Aurélia et Zoé, dont l'indulgence et la tolérance ont été sans bornes. Ces dernières années ont été éprouvantes pour elles. Sans leur compréhension et le très généreux appui financier de Chantal cette thèse n'aurait jamais pu être achevée.

À Zoé, Aurélia et Chantal

À la mémoire de mon père, Pierre

CHAPITRE 1: REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 L'ENCÉPHALOPATHIE PORTO-SYSTÉMIQUE

L'encéphalopathie hépatique (EH) est une condition caractérisée par un ensemble de désordres neurologiques. On distingue deux formes principales d'EH, soit l'encéphalopathie porto-systémique chronique (EPS) et l'encéphalopathie associée à une dégénérescence hépatique aiguë.

L'encéphalopathie porto-systémique, la forme la plus courante d'encéphalopathie, se développe de deux manières chez l'humain. Premièrement, lors d'une cirrhose, l'engorgement du foie entraîne une hypertension portale résultant en la formation de vaisseaux collatéraux entre la circulation systémique et la circulation porte. Deuxièmement, lorsque l'hypertension portale est trop grande et entraîne des complications comme des varices et des saignements œsophagiens ou gastro-intestinaux, on a souvent recours à une dérivation d'une partie de la veine porte vers la circulation systémique afin de réduire l'hypertension (Transjugular Intrahepatic Portacaval Shunt, ou TIPS). Dans les deux cas, une partie du sang venant des viscères ne passe plus par le foie et reste chargée de toxines, ce qui entraîne une EPS.

L'encéphalopathie associée à une dégénérescence hépatique aiguë, comme celle observée lors de certaines hépatites ou lors d'un empoisonnement avec de l'acétaminophène, évolue rapidement de la confusion au coma en général en quelques heures ou quelques jours. L'œdème cérébral et l'augmentation de la pression intracrânienne qui en résulte, provoquent rapidement la mort

par un engagement cérébral, c'est-à-dire une compression des centres nerveux responsables de la respiration et du rythme cardiaque.

Le propos de cette thèse étant l'encéphalopathie porto-systémique chronique, le terme d'encéphalopathie hépatique sera donc employé dans ce sens sauf lorsqu'il sera fait spécifiquement référence à la forme aiguë.

1.1.1 Manifestations cliniques

Traditionnellement, on classe les encéphalopathies en quatre grades basés sur différents symptômes observables cliniquement. Le grade 1 correspond à des symptômes précoces de l'EPS, comme des altérations subtiles de l'état de conscience, une attention réduite, de la dépression ou de l'euphorie, une irritabilité, de l'anxiété, ainsi que des cycles d'éveil et de sommeil anormaux. Au grade 2, ces symptômes progressent en désorientation, en amnésie, en léthargie avec ou sans changements de personnalité et par l'apparition d'astérisis. Le grade 3 se caractérise par de la somnolence, de la confusion, la stupeur, le délire et des réflexes de Babinski. Puis, au grade 4 le coma apparaît (Adams, R.D. et Foley, J.M. 1953). Généralement on peut remarquer une hyperventilation, provoquée par la stimulation du centre respiratoire par l'hyperammoniémie cérébrale, ainsi qu'une alcalose respiratoire proportionnelle au degré d'encéphalopathie chez les patients aux grades 3 et 4 (Posner, J.B. et Plum, F. 1960). Rappelons qu'une alcalose respiratoire survient lorsque le taux plasmatique de CO_2 diminue suite à une hyperventilation, faisant en sorte qu'une partie du tampon bicarbonate HCO_3^- est convertie en CO_2 et en OH^- .

Chez les patients souffrant d'EPS, l'ammoniaque plasmatique et cérébrale est invariablement augmentée suite au détournement vers la périphérie du sang venant des viscères ainsi qu'à la perte de la fonction hépatique (Szerb, J.C. et Butterworth, R.F. 1992). Les symptômes de l'EPS peuvent apparaître ou sont aggravés par des conditions qui augmentent l'ammoniaque plasmatique telles qu'un apport alimentaire en protéines accru, des saignements gastro-intestinaux ou l'utilisation de sédatifs (Butterworth, R.F. 2000). Les thérapies utilisées pour traiter l'EPS visent souvent à réduire l'ammoniaque plasmatique en limitant sa production dans l'intestin (Néomycine ou lactulose) ou en réduisant sa concentration par d'autres mécanismes (benzoate de sodium, phénylacétate, L-carnitine) (Hazell, A.S. et Butterworth, R.F. 1999).

Le fait que les symptômes d'une EPS soient réversibles, suite à une transplantation hépatique par exemple, laisse penser que la source de cette atteinte est métabolique plutôt que structurelle (Hazell, A.S. et Butterworth, R.F. 1999). Tout porte à croire que cette dérivation du sang portal vers la périphérie est la cause première de l'EPS. En effet, la construction chirurgicale d'une anastomose porto-cave chez des patients ayant une fonction hépatique normale au cours d'une résection de néoplasme pancréatique, a conduit à l'apparition d'épisodes d'EPS (McDermott, W.V. et Adams, R.D. 1954).

L'EPS peut également être "subclinique", c'est-à-dire que chez ces patients, l'évaluation de l'état neurologique effectuée à l'aide de tests standard est normale mais ils ont tout de même des déficits subtils de leurs fonctions cognitives et motrices. La prévalence de ce type d'encéphalopathie peut atteindre 84% chez les patients cirrhotiques lorsqu'ils sont évalués à l'aide de tests plus sensibles (Quero, J.C. et Schalm, S.W. 1996).

1.1.2 Effets de l'âge

Les premières références à une influence de l'âge sur l'EPS remontent aux années soixante et soixante-dix où l'on observa que les patients présentant les signes d'encéphalopathie les plus prononcés, suite à la construction chirurgicale d'une anastomose porto-cave, étaient significativement plus âgés que les autres (Kardel, T. 1974; Read, A.E. *et al.* 1961). En plus d'identifier une corrélation entre l'âge et l'EPS, ces premières études en ont identifié une autre entre l'EPS et la capacité hépatique d'élimination du galactose (Kardel, T. 1974). Ces auteurs suggéraient qu'il y a peut-être une baisse du métabolisme hépatique en fonction de l'âge, mais cette dernière corrélation ne fut pas confirmée par les études subséquentes.

Ce n'est que plus récemment que des études cliniques avec de plus larges effectifs ont identifié l'âge comme étant un facteur de risque dans le développement de l'EPS (Cabrera, J. *et al.* 1996; Ong, J.P. *et al.* 2000; Rössle, M. *et al.* 1994; Sanyal, A.J. *et al.* 1994; Siegerstetter, V. et Rossle, M. 1997; Zuckerman, D.A. *et al.* 1997). Quelques études randomisées comparant des patients ayant subi un TIPS à un groupe équivalent ayant subi une sclérothérapie, ont identifié un âge avancé ainsi qu'un passé médical d'EPS comme étant les seuls facteurs de risque de développer de nouveaux épisodes d'EPS (Cabrera, J. *et al.* 1996; Sanyal, A.J. *et al.* 1994). Parmi les patients ayant subi un TIPS, on a observé également que ceux chez qui il y a aggravation ou développement de nouveaux épisodes d'EH sont significativement plus vieux que les autres (64 ± 8 vs 54 ± 12 ans $p < 0.05$) (Rössle, M. *et al.* 1994)

Comme on peut le constater, la littérature clinique à ce sujet commence seulement à apparaître et l'évaluation des effets de l'âge sur un modèle animal d'EPS fait toujours défaut.

1.1.3. L'encéphalopathie porto-systémique est associée à une atteinte astrocytaire

L'EPS provoque des changements presque exclusivement astrocytaires, à tel point qu'on la décrit comme une "gliopathie". Avant d'aller plus loin dans l'étude de l'histopathologie, un bref rappel de la physiologie des astrocytes est souhaitable.

1.1.3.1 Physiologie des astrocytes

Les astrocytes sont les cellules les plus nombreuses du système nerveux central et sont en contact intime avec les axones, les boutons synaptiques et les capillaires sanguins. Ils sont au centre des échanges métaboliques du cerveau et forment une barrière extrêmement efficace entre les neurones et le sang que l'on dénomme barrière hémato-encéphalique.

Ces cellules sont impliquées dans la régulation étroite de la composition du milieu extracellulaire et exercent de nombreuses autres fonctions comme la synthèse des précurseurs de neurotransmetteurs à l'intention des neurones, la détoxification de nombreux composés endogènes ou exogènes, ainsi que le maintien de l'homéostasie de différents ions (K^+ , H^+ , Ca^{2+} etc.).

Les astrocytes sont également le siège d'un phénomène assez singulier, décrit pour la première fois par Cornell-Bell *et al* (1990), à l'effet qu'une dépolarisation ainsi que l'entrée de Ca^{2+} induite par du glutamate (Glu) peut se propager aux autres astrocytes environnants (Cornell-Bell, A.H. *et al.* 1990). Les astrocytes forment ainsi un immense syncytium formé par des jonctions GAP laissant passer le Ca^{2+} entre astrocytes adjacents (Giaume, C. et McCarthy, K.D. 1996). Il a été proposé depuis que cette communication à longue portée dans le réseau d'astrocytes serait le mécanisme à la base de leur adaptation aux besoins neuronaux (Nedergaard, M. 1994).

Des données récentes laissent penser que la communication entre les neurones et les astrocytes est plus intense que l'on ne l'avait cru. Les neurones libérant des facteurs trophiques à l'intention des astrocytes qui en retour régularisent la composition du milieu extracellulaire, les soutiennent métaboliquement et pourraient même influencer la neurotransmission (Nedergaard, M. 1994).

1.1.3.2 Histopathologie

Du point de vue histologique, on observe lors d'une EPS un changement caractéristique des astrocytes qui a été décrit pour la première fois par von Hösslin et Alzheimer (1912) et que l'on appelle maintenant une astrocytose Alzheimer de type II. Cette atteinte n'a rien à voir avec la maladie d'Alzheimer, plus familière, en dehors d'avoir été décrite par le même chercheur.

Typiquement on observe un gonflement des astrocytes, une prolifération et un gonflement des mitochondries (Norenberg, M.D. 1977) ainsi qu'une vacuolisation (Zamora, A.J. *et al.* 1973). On retrouve dans ces cellules un

noyau pâle, gonflé parfois lobulé et souvent associé à un imposant nucléole dans lequel on trouve de temps à autre une accumulation de glycogène (Butterworth, R.F. *et al.* 1987; Gregorios, J.B. *et al.* 1985; Norenberg, M.D. 1990; von Hösslin, C. et Alzheimer, A. 1912) (Figure 1.1). On observe également une multiplication importante des ribosomes et des membranes intracellulaires lisses (Zamora, A.J. *et al.* 1973).

L'astrocytose Alzheimer de type II n'est pas un phénomène uniforme dans le cerveau. Les régions les plus touchées sont le cortex, les noyaux gris centraux et le cervelet (Adams, R.D. et Foley, J.M. 1953), alors que le tronc cérébral et la moelle épinière sont épargnés (Blei, A.T. *et al.* 1992).

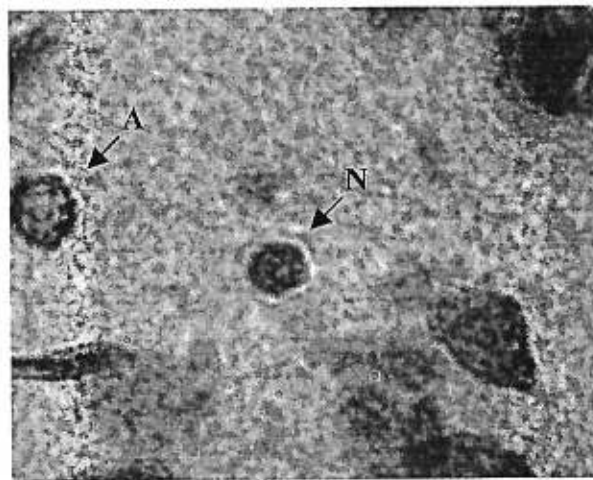


Figure 1.1 Astrocytes Alzheimer de type II (A) et astrocytes normaux (N) dans le cortex frontal de rat suite à une APC de quatre semaines suivie par l'injection d'acétate d'ammonium (3.8 mmol/kg).

L'astrocytose Alzheimer de type II a été observée dans plusieurs modèles animaux (Tableau 1.1). L'apparition de l'astrocytose Alzheimer de type II

semble être directement proportionnelle à la concentration d'ammoniaque à laquelle sont exposés les astrocytes (Tableau 1.1). En effet, certains auteurs n'ont pas observé d'astrocytose de type II chez les rats ayant une APC alors que tous en ont constaté lorsqu'ils ont administré une surcharge d'ammoniaque à ces mêmes animaux (Tableau 1.1).

Il est intéressant de noter que chez le rat, cette atteinte apparaît principalement lorsque la concentration d'ammoniaque plasmatique atteint des niveaux entre 300 et 1000 $\mu\text{g/dl}$ alors que, chez le singe on l'observe à des niveaux légèrement plus bas d'environ 200 à 300 $\mu\text{g/dl}$. Chez l'humain également on voit apparaître l'astrocytose à des niveaux d'ammoniaque plasmatique légèrement plus bas soit de 62 $\mu\text{mol/l}$ (Boogerd, W. *et al.* 1990) ou 150 $\mu\text{g/dl}$ (Taylor, P. *et al.* 1979). Une étude plus exhaustive a montré que chez l'humain, on voit une progression de l'astrocytose avec l'augmentation de la concentration d'ammoniaque, d'inexistante à des niveaux d'environ 100 $\mu\text{g/dl}$ (normale <94 $\mu\text{g/dl}$), elle devient sévère à environ 200 à 300 $\mu\text{g/dl}$ (Martin, H. *et al.* 1987). Dans le même ordre d'idée, le volume nucléaire des astrocytes Alzheimer de type II est moins grand chez les rats ayant une APC (125 μ^3) que chez des patients cirrhotiques (170 à 190 μ^3), alors que les individus normaux dans les deux cas ont un volume nucléaire d'environ 90 à 100 μ^3 (Cavanaugh, J.B. *et al.* 1971).

Norenberg *et al.* (77) ont été capables de corrélérer le statut neurologique et les changements astrocytaires induits chez des rats ayant une APC puis gavés avec des résines libérant de l'ammoniaque. Chez l'humain on observe exactement les mêmes changements astrocytaires en corrélation avec les symptômes cliniques et l'ammoniaque plasmatique (Martin, H. *et al.* 1987).

Tableau 1.1: Sommaire des principaux résultats publiés sur l'astrocytose Alzheimer de type II dans divers modèles animaux.

Auteurs	Astrocytose type II	Volume nucléaire	Gliose	Nécrose Neurones	Ammoniaque plasmatique
Rats APC (1 à 35 sem)					
(Cavanagh et Kyu, 1971)	+	+	-	-	÷ 350 µg/dl
(Cavanagh <i>et al.</i> 1971)	+	+	-	-	÷ 400 µg/dl
(Cavanagh <i>et al.</i> 1972)	+	+	-	-	÷ 300 µg/dl
(Zamora, A.J. <i>et al.</i> 1973)	- ^a	+	-	-	n.r.
(Norenberg et Lapham 1974)	-	n.r.	-	-	÷ 400 µg/dl
(Norenberg <i>et al.</i> 1974)	-	-	-	-	÷ 400 µg/dl
(Diemer <i>et al.</i> 1977)	- ^a	+	+	+ ^b	÷ 300 µg/dl
(Norenberg 1977)	-	-	-	-	÷ 300 µg/dl
(Pilbeam <i>et al.</i> 1983)	-	+	-	-	÷ 200 µg/dl
Rats APC + ammoniaque					
(Norenberg et Lapham 1974)	+	+	+	-	÷ 1000 µg/dl
(Norenberg <i>et al.</i> 1974)	+	+	+	-	÷ 1000 µg/dl
(Pilbeam <i>et al.</i> 1983)	+	+	+	+	÷ 1000 µg/dl
(Norenberg 1977)	+	+	+	n.r.	÷ 1000 µg/dl
Singe APC (7 à 30 sem)					
(Taylor <i>et al.</i> 1979)	+	+	+	-	÷ 200 µg/dl
Singe + ammoniaque					
(Cole <i>et al.</i> 1972)	+	n.r.	+	-	÷ 300 µg/dl

+ présent,

- absent,

n.r. non rapporté

^a Fixation par perfusion qui n'entraîne pas d'astrocytose de type II (voir texte pour explications)

^b Ils n'ont pas observé de nécrose comme telle mais une baisse du nombre de neurones après 22 semaines d'anastomose porto-cave.

Chez les astrocytes en culture, l'augmentation de la taille des nucléoles semble également être proportionnelle à la concentration d'ammoniaque à laquelle ils sont exposés, ainsi qu'à la durée du traitement (Gregorios, J.B. *et al.* 1985). Par contre cette équipe a utilisé principalement une concentration d'acétate d'ammoniaque de 10 mM ce qui est bien au-dessus de la concentration cérébrale d'ammoniaque observée lors d'une encéphalopathie hépatique humaine (1 mM) (Vergara, F. *et al.* 1974; Watanabe, A. *et al.* 1984) ou expérimentale (4-5 mM) (Butterworth, R.F. *et al.* 1988).

Le lien entre l'hyperammoniémie et les modifications astrocytaires a été renforcé par la localisation immunohistochimique de la glutamine synthétase (GS) dans les astrocytes (Martinez-Hernandez, A. *et al.* 1977). C'est cette enzyme qui catalyse la conversion du Glu et de l'ammoniaque en glutamine (Gln), participant ainsi à la détoxification de l'ammoniaque dont il sera question dans une section subséquente. Cette même étude a également montré que la GS immunoréactive est augmentée dans les astrocytes de rats ayant une APC et gavés avec des résines libérant de l'ammoniaque. Dans le même ordre d'idée, l'inhibition de cette enzyme par la L-Méthionine Sulfoximine (MSO) provoque une astrocytose Alzheimer de type II chez des rats normaux (Gutierrez, J.A. et Norenberg, M.D. 1975; Gutierrez, J.A. et Norenberg, M.D. 1977). Ceci suggère que l'ammoniaque est bel et bien la cause de l'apparition de l'astrocytose Alzheimer de type II.

Cette vision est d'autant plus renforcée par le fait que les patients ayant des déficiences enzymatiques du cycle de l'urée, et par le fait même hyperammoniémiques, présentent une astrocytose Alzheimer de type II (Bruton, C.J. *et al.* 1970; Campbell, A.G. *et al.* 1973; Lewis, P.D. et Miller, A.L. 1970; Martin, J.J. et Schlote, W. 1972; Packman, S. *et al.* 1978). On observe

également l'apparition d'astrocytes Alzheimer de type II chez des patients ayant une fonction hépatique normale mais devenus hyperammoniémiques pour d'autres raisons (Boogerd, W. *et al.* 1990; McDermott, W.V. et Adams, R.D. 1954).

Parmi les autres changements que l'on peut noter au niveau des astrocytes, il y a un déclin de l'expression du GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), une protéine cytoplasmique faisant partie du cytosquelette (filaments intermédiaires), tant chez des cultures d'astrocytes exposées à des concentrations d'ammoniaque de l'ordre du millimolaire (Norenberg, M.D. *et al.* 1990), que chez le modèle animal (Sobel, R.A. *et al.* 1981). Toujours chez le rat ayant une APC, un autre rapport fait plutôt état d'une augmentation de l'expression du GFAP dans les astrocytes de Bergmann alors que dans les autres astrocytes du cervelet, il est à la baisse (Suárez, I. *et al.* 1992). Par contre cette hausse de l'expression de GFAP dans les cellules gliales de Bergmann n'a pas pu être reproduite dans le cervelet d'humains décédés à la suite d'un coma hépatique, laissant penser que l'atteinte humaine pourrait être légèrement différente (Kril, J.J. *et al.* 1997).

Le fait que l'on retrouve souvent des astrocytes Alzheimer de type II par paire a conduit à l'hypothèse que ce type de cellule soit en division (Lapham, L.W. 1962). Par contre, aucune des caractéristiques des cellules mitotiques (centrioles et microtubules) n'est observable chez les astrocytes Alzheimer de type II (Norenberg, M.D. 1981). Une étude de microspectrophotométrie sur des tranches de cortex d'humains décédés des suites d'une EH a montré que chez un petit nombre d'astrocytes la quantité d'ADN double, ce qui laisse à penser que ces cellules se préparent à une division (Lapham, L.W. 1962). Mais encore une fois aucune des caractéristiques de la mitose n'a pu être mis

en lumière dans cette étude.

Si toutes les études sur le sujet ont montré une augmentation du nombre d'astrocytes Alzheimer de type II suite à une exposition à l'ammoniaque, très peu ont pu démontrer une augmentation du nombre total d'astrocytes laissant penser qu'il s'agit d'une transformation des astrocytes normaux en astrocytes Alzheimer de type II (Norenberg, M.D. 1981).

L'injection de ^3H -thymidine à des animaux ayant subi une APC a montré qu'il y a incorporation de ce marqueur dans le noyau des astrocytes Alzheimer de type II, suggérant une synthèse active d'ADN (Brumback, R.A. et Lapham, M.D. 1989). Par contre, ces auteurs n'ont pas pu observer de signes de mitose chez les astrocytes Alzheimer de type II, bien que ces signes soient évidents chez les cellules épithéliales de l'intestin en constante division. À la lumière de ces données, il semble que les astrocytes Alzheimer de type II synthétisent de l'ADN mais qu'ils ne sont pas en division active. Il est possible que les dérangements métaboliques de ces cellules envoient des signaux de mitose au noyau sans toutefois stimuler la division.

Il est remarquable qu'à de très rares exceptions, aucune équipe n'a pu mettre en évidence une atteinte neuronale de manière histologique (Tableau 1.1). Les neurones semblent en bon état et n'exhibent pas de modifications majeures malgré qu'à leur côté il y ait des masses d'astrocytes Alzheimer de type II.

Pour finir, on se doit de souligner que les changements, dont il a été question ici, semblent être liés à la fixation des tissus par immersion car la fixation par perfusion n'entraîne pas d'astrocytose Alzheimer de type II (Cavanagh, J.B. et Kyu, M.H. 1971; Norenberg, M.D. et Lapham, L.W. 1974; Rizzuto, N. et

Gonatas, N.K. 1974). Certains ont également émis l'hypothèse que le traitement des tranches dans des bains successifs d'alcool pouvait contribuer à ce phénomène (Gutierrez, J.A. et Norenberg, M.D. 1975). Quoique l'astrocytose Alzheimer de type II semble être un artefact de fixation et que les astrocytes *in vivo* n'ont vraisemblablement pas cet aspect, il reste que ces changements surviennent uniquement après une exposition à l'ammoniaque et sont clairement le reflet d'une atteinte astrocytaire.

1.1.4 Modèles animaux d'encéphalopathie porto-systémique

1.1.4.1 Anastomose porto-cave chez le rat

Les premières dérivations portales, c'est-à-dire le détournement du flux sanguin portal vers la circulation systémique, ont été réalisées chez le chien par Eck en 1877 (Eck, N.V. 1953). Il faudra attendre 1903 avec les travaux de Vidal (Vidal, M. 1903) pour que ce type d'intervention soit utilisé avec succès pour traiter l'ascite. Ce n'est qu'en 1945 qu'une étude exhaustive des effets de cette intervention sur l'hypertension portale a été entreprise par Whipple puis quelques années plus tard par Blackemore (Blakemore, A.H. 1955; Whipple, A.O. 1945). En 1961, Lee et Fisher et en 1963 Bismuth *et al.* mettaient au point une technique d'anastomose par micro-suture vasculaire qui est rapide, fiable et reproductible (Bismuth, H. *et al.* 1963; Lee, S.H. et Fisher, B. 1961). Depuis ce temps l'anastomose porto-cave (APC) chez le rat constitue un modèle de choix pour l'étude de l'encéphalopathie porto-systémique chronique.

Par contre, certaines précautions sont à prendre pour éviter d'introduire des biais. Par exemple, il est impératif de comparer les rats ayant subi une APC

avec un groupe contrôlé ayant subi le même stress opératoire ainsi que la même interruption du flot sanguin portal et cave (fausse intervention) afin d'éviter les biais occasionnés par ce stress.

Les rats porteurs d'une APC présentent une encéphalopathie latente et ont la plupart des anomalies biochimiques, histologiques et comportementales qui sont caractéristiques de l'atteinte humaine (Blei, A.T. *et al.* 1992). On y observe une hyperammoniémie plasmatique et cérébrale (Ehrlich, M. *et al.* 1980), l'apparition d'une astrocytose Alzheimer de type II (Cavanagh, J.B. et Kyu, M.H. 1971; Zamora, A.J. *et al.* 1973), un gonflement des astrocytes périvasculaires (Swain, M.S. *et al.* 1991) ainsi qu'une atrophie testiculaire (Martin, J.R. *et al.* 1980; Van Thiel, D.H. *et al.* 1985) comparables aux données humaines. Une atrophie hépatique assez marquée apparaît rapidement suite aux changements de la perfusion du foie et est directement liée au degré d'ouverture de l'anastomose (Coy, D.L. *et al.* 1991).

En général, les rats ayant subi une APC ne gagneront pas de poids ou même peuvent en perdre légèrement durant les premiers dix à quinze jours post-opératoires, suivi d'un gain de poids qui va au même rythme que les animaux avec une fausse intervention (Coy, D.L. *et al.* 1991).

À l'instar des modifications des cycles d'éveil et de sommeil chez les patients atteints d'EPS (Bergonzi, P. *et al.* 1978; Córdoba, J. *et al.* 1998; Kurtz, D. *et al.* 1972; Wiltfang, J. *et al.* 1999) l'APC chez le rat provoque une altération des cycles d'activité ambulatoire (Therrien, G. *et al.* 1995). De nombreuses études ont montré que l'activité des rats anastomosés diminue sensiblement, surtout dans sa portion nocturne qui correspond à leur période active, alors que l'activité diurne n'est presque pas affectée (Coy, D.L. *et al.* 1992; Therrien, G. *et al.* 1995; Tricklebank, M.D. *et al.* 1978; Zee, P.C. *et al.* 1991). De plus, une

réduction de la durée totale du sommeil a déjà été décrite dans ce modèle animal (Beaubernard, C. *et al.* 1980; Lantin, N. *et al.* 1979; Monmaur, P. *et al.* 1976). Ces symptômes sont comparables à ceux observés chez l'EPS humaine (Wiltfang, J. *et al.* 1999) au stade 0, c'est-à-dire une EPS minimale ou subclinique (Blei, A.T. *et al.* 1992).

Des études ont déjà démontré que chez les rats ayant une APC, il y a une réduction de l'activité ambulatoire et exploratrice concomitante avec l'apparition d'une astrocytose Alzheimer de type II (Mariani, P. *et al.* 1996; Ribeiro, J. *et al.* 1992).

Chez ces animaux, 6 à 8 jours après l'opération, on note également une légère augmentation du pH intracellulaire au niveau des astrocytes corticaux (Swain, M.S. *et al.* 1991). Par contre, 4 semaines après l'opération on ne peut observer de changements de pH global du cerveau tel que mesuré par résonance magnétique nucléaire (RMN) (Fitzpatrick, S.M. *et al.* 1988).

On observe une baisse progressive de l'ammoniaque plasmatique commençant environ 8 à 12 semaines après l'intervention (Cavanagh, J.B. et Kyu, M.H. 1971). Ce lent retour à la normale, pouvant s'échelonner sur une vingtaine de semaines, est variable d'un animal à l'autre et on pense qu'il est dû à une revascularisation du foie et à la formation de vaisseaux collatéraux (Kyu, M.H. et Cavanagh, J.B. 1970).

1.1.4.2 Administration de tétrachlorure de carbone

Quoique l'alcool soit l'une des causes majeures de la cirrhose chez l'humain, il est généralement admis que l'administration d'alcool seul à des rongeurs de

laboratoire n'est pas suffisante pour induire une cirrhose. La méthode la plus commune pour l'induction expérimentale de cirrhose est l'administration d'une hépatotoxine, le tétrachlorure de carbone (CCl_4). Cependant, les premières études utilisant ce procédé produisaient des résultats imprévisibles et souvent inconsistants.

Le problème majeur que l'on rencontre pour produire une cirrhose avec le CCl_4 est la variabilité de la réponse des différents sujets à l'hépatotoxine (Blei, A.T. *et al.* 1992). Par exemple, une dose de CCl_4 qui n'a pas d'effet à long terme sur le foie d'un rat, peu importe le temps de l'exposition, peut facilement entraîner la mort en 2 à 7 jours chez un autre (Proctor, E. et Chatamra, K. 1984). Ceci fait en sorte que la production d'une cirrhose comparable entre les différents rats du groupe exposé, est presque impossible sans un ajustement des doses en fonction de la susceptibilité de chaque sujet. Une telle méthode a été mise au point et implique l'administration intragastrique hebdomadaire (en 7 à 10 sem) de CCl_4 et d'un suivi quotidien du poids de l'animal afin de rectifier la dose en fonction de la réponse de l'animal (Proctor, E. et Chatamra, K. 1984).

Suite à l'induction d'une telle cirrhose on retrouve des changements pathologiques reproductibles tels qu'une hyperammoniémie, une surface du foie finement nodulaire, une dérivation sanguine portale vers la périphérie, un élargissement de la rate, une atrophie testiculaire, une hypertension portale, une baisse de l'albumine plasmatique et finalement la production d'ascite (Blei, A.T. *et al.* 1992).

1.1.4.3 Obstruction des voies biliaires

On sait depuis longtemps que la ligature des voies biliaires provoque une cirrhose biliaire (Cameron, G.R. et Hasan, S.M. 1958; Cameron, G.R. et Oakley, C.L. 1932; Trams, E.G. et Symeonidis, A. 1983). Ici encore une certaine variabilité semble être présente car certains auteurs rapportent avoir produit une cirrhose avec cette méthode chez le rat en 3 à 5 semaines (Cameron, G.R. et Hasan, S.M. 1958) alors que d'autres étaient incapables d'observer une cirrhose jusqu'à 40 jours suite à l'intervention (Franco, D. *et al.* 1979; Johnstone, J.M. et Lee, E.G. 1976).

Comme la technique du CCl₄, les rats développent une cirrhose et de l'ascite reproduisant assez fidèlement les changements survenant chez l'humain. Cette méthode a néanmoins l'avantage de ne pas exposer les rats à une toxine et à ses effets sur d'autres organes que le foie. Ce point est toutefois contrebalancé par l'impossibilité de varier la cause, c'est-à-dire la ligature, pour s'ajuster à l'effet variable d'un sujet à l'autre comme dans le cas du CCl₄. Ainsi, il devient assez ardu de produire une cirrhose reproductible et équivalente entre les sujets d'un même groupe.

1.1.4.4 Diète contenant des sels d'ammoniaque

L'attrait de ce modèle animal vient de sa simplicité. En effet, il suffit de donner une diète contenant des sels d'ammoniaque pour que les rats deviennent modérément hyperammoniémiques (Semon, B.A. *et al.* 1989). En dépit de l'apparente simplicité de la méthode, il y a certains écueils. Tout d'abord, au lieu des deux groupes classiques (contrôles et hyperammoniémiques), on doit en avoir un troisième qui correspond à des rats appariés pour la quantité de

nourriture consommée par les rats ayant la diète à l'ammoniaque. Comme on pourrait s'y attendre, les rats hyperammonémiques ne consomment pas autant de nourriture que s'ils étaient nourris *ad libitum* avec une diète standard (Azorin, I. *et al.* 1989). L'apport alimentaire étant moindre il faut pouvoir prouver qu'il n'a pas d'effet sur les mesures que l'on veut effectuer. Certains auteurs ont tenté de contourner le problème par l'entraînement des rats et l'administration de diètes spéciales avant l'expérience (Semon, B.A. *et al.* 1988), mais la popularité de cette approche reste limitée.

Malgré que ce modèle élève modérément les niveaux d'ammoniaque plasmatiques et cérébraux, il n'en demeure pas moins que la fonction hépatique reste intacte contrairement aux animaux avec une APC ou une cirrhose. Par exemple, les rats ayant reçu une diète à base d'ammoniaque sont moins sensibles à l'injection d'un bolus d'ammoniaque (Miñana, M.D. *et al.* 1988), alors que les rats ayant une APC le sont beaucoup plus (Cooper, A.J. et Lai, J.C. 1987; Hindfelt, B. *et al.* 1977).

Les causes de cette différence sont ouvertes au débat et font en sorte que ce modèle animal sera difficilement comparable avec l'atteinte humaine tant que les mécanismes impliqués ne seront pas mieux compris.

1.2 SUBSTANCES NEUROTOXIQUES PRODUITES LORS DE MALADIES HÉPATIQUES CHRONIQUES

1.2.1 Liens entre l'accumulation de manganèse et l'encéphalopathie porto-systémique

De récents travaux ont fait en sorte que le rapport entre l'encéphalopathie

hépatique et l'accumulation de manganèse dans le cerveau de patients souffrant de maladies hépatiques chroniques devienne de plus en plus clair. On observe une hyperintensité du globus pallidus en imagerie par résonance magnétique nucléaire (RMN) pondérée en T1 chez plus de 80% des patients cirrhotiques (Butterworth, R.F. *et al.* 1995; Inoue, E. *et al.* 1991; Kulisevsky, J. *et al.* 1992; Spahr, L. *et al.* 1996; Weissenborn, K. *et al.* 1995). L'analyse directe des tissus provenant de patients décédés des suites d'un coma hépatique a montré qu'il s'agit d'une forte augmentation (190%) de la concentration de manganèse (Krieger, D. *et al.* 1995; Pomier Layrargues, G. *et al.* 1995). Chez les rats ayant une APC on trouve également une hausse (70%) de la concentration de manganèse dans les régions pallidales (Rose, C. *et al.* 1999).

Le manganèse est excrété par voie biliaire (Papavasiliou, P.S. *et al.* 1966) et les concentrations de manganèse sont systématiquement augmentées dans le sang des patients cirrhotiques chez qui l'on observe une hyperintensité pallidale en imagerie RMN pondérée en T1 (Hauser, R.A. *et al.* 1994; Spahr, L. *et al.* 1996). Ce genre d'hyperintensité pallidale a également été constaté lors d'intoxications industrielles au manganèse (Nelson, K. *et al.* 1993).

L'examen histologique a révélé l'apparition d'une astrocytose Alzheimer de type II chez les patients morts des suites d'un coma hépatique chez qui auparavant on avait remarqué une hyperintensité pallidale par imagerie RMN pondérée en T1 (Kulisevsky, J. *et al.* 1992; Weissenborn, K. *et al.* 1995). Chez des primates intoxiqués avec du manganèse, on note également une telle formation d'astrocytes Alzheimer de type II (Pentschew, A. 1964) ainsi qu'une hyperintensité pallidale en imagerie RMN (Newland, M.C. *et al.* 1989).

En plus de ces données cliniques, on a remarqué que l'exposition *in vitro* de

été observée chez des patients dont la fonction hépatique était normale mais qui étaient hyperammoniémiques suite à une déchirure de la vessie (Boogerd, W. *et al.* 1990) ou suite à une APC au cours d'une résection de néoplasmes pancréatiques (McDermott, W.V. et Adams, R.D. 1954) vient appuyer cette thèse. Chez ces mêmes patients on a pu noter l'apparition d'une astrocytose Alzheimer de type II ce qui confirme le lien entre l'EPS, l'astrocytose et l'hyperammoniémie.

1.2.3 Production et élimination de l'ammoniaque

L'action bactérienne dans l'intestin produit une grande quantité d'ammoniaque qui s'ajoute à celui relié au catabolisme normal des acides aminés dans différents organes (Cooper, J.L. 1996). Le foie reçoit directement la plus grande partie de l'ammoniaque en provenance des intestins via la veine porte. Une part moins importante peut également être réintroduite dans la circulation par les reins dans certaines conditions (Cooper, J.L. 1996).

1.2.3.1. Élimination par le foie

Le foie est l'organe prépondérant pour la transformation des déchets métaboliques azotés en une forme non toxique facilement excrétable. La capacité d'élimination de l'ammoniaque telle quelle est assez limitée et celle-ci devient toxique, particulièrement pour le système nerveux central, lorsqu'elle est en trop grande concentration dans le sang. Le foie possède deux mécanismes de détoxification de l'ammoniaque, le premier étant la synthèse de l'urée dans les hépatocytes périportaux et l'autre la synthèse de

Gln à partir de Glu et d'ammoniaque par la GS des hépatocytes périveineux (Cooper, J.L. 1996). La production d'urée par les hépatocytes péri-portaux correspond à la ligne de front car ils possèdent une grande capacité de détoxification et métabolisent jusqu'à 70% de l'ammoniaque plasmatique (Häussinger, D. *et al.* 1984). Ce qui reste d'ammoniaque dans le sang arrive aux hépatocytes périveineux qui ont une moins grande capacité que les hépatocytes périportaux mais une plus grande affinité (Häussinger, D. *et al.* 1984). La combinaison de ces deux mécanismes et leur organisation dans le foie en font un système très efficace de détoxification de l'ammoniaque.

La formation de l'urée par le foie découle de l'activité du cycle de l'urée dans les hépatocytes périportaux. L'urée est formée de deux molécules d'azote dont l'une provient de l'ammoniaque, alors que la deuxième vient de l'aspartate. Il est à noter qu'il y a un prix à payer pour la synthèse de l'urée, car pour chaque molécule d'urée produite il y a hydrolyse de quatre liens phosphates de haute énergie (Cooper, J.L. 1996).

L'urée et la Gln ainsi formées retournent dans la circulation systémique pour être excrétées par le rein.

1.2.3.2 Élimination par le muscle

Outre sa conversion en urée par le foie, l'ammoniaque peut être incorporé au Glu pour former de la Gln dans le muscle, via l'enzyme GS. Malgré que la quantité de GS dans le muscle soit relativement faible, on croit que la proportion énorme de muscle dans l'organisme (40% du poids) fait en sorte que celui-ci est tout de même un site de détoxification important de l'ammoniaque (Girard, G. et Butterworth, R.F. 1992).

Les premières études sur la détoxification de l'ammoniaque par le muscle ont montré que chez des sujets normaux il y a une extraction de l'ammoniaque par le muscle de l'avant-bras et que cette extraction était grandement réduite par l'atrophie musculaire (Ganda, O.P. et Ruderman, N.B. 1976). Des travaux utilisant la tomographie à émission de positrons (PET) avec le traceur ^{13}N -ammoniaque ont permis d'évaluer la clairance de l'ammoniaque pour l'organisme en entier à 1 mole/jour chez des patients avec une APC et à 0.66 mole/jour chez les normaux (Lockwood, A.H. *et al.* 1979). Cette étude a montré que le cerveau ne métabolise qu'environ 7 % de l'ammoniaque circulant, et que le foie, le cerveau, le sang et la vessie ensemble totalisent environ 30 % de l'ammoniaque injecté. Leurs données suggèrent qu'une grande part de l'ammoniaque circulant est métabolisée dans le muscle squelettique.

1.2.3.3 Élimination par le rein

Comme mentionné plus haut, une alternative à la détoxification de l'ammoniaque via le cycle de l'urée est la synthèse de la Gln. Dans le rein, la Gln peut servir de précurseur pour l'excrétion de l'ammoniaque via sa désamidation par une glutaminase intramitochondriale phosphate dépendante. Le NH_3 ainsi produit dans les cellules du tube rénal n'étant pas chargé, il peut aisément diffuser dans la lumière tubulaire et se combiner alors aux ions H^+ présents. L'ion NH_4^+ qui en résulte ne peut guère rediffuser car sa charge l'empêche de traverser les membranes facilement et sera donc excrété.

Chez les rats avec une APC on trouve de fortes augmentations des

concentrations artérielles de Gln (APC, 697 μ M, contrôles, 513 μ M) et d'ammoniaque (APC, 247 μ M, contrôles, 51 μ M) (Dejong, C.H. *et al.* 1993c) qui favorisent l'excrétion de l'ammoniaque par le rein. Effectivement, de nombreuses études comparatives ont montré hors de tout doute que dans les cas d'hyperammoniémie modérée, le rein permet de se débarrasser d'une partie du surplus d'ammoniaque par ce mécanisme (Dejong, C.H. *et al.* 1993b; Dejong, C.H. *et al.* 1993c; Dejong, C.H. *et al.* 1996; Heeneman, S. *et al.* 1994). On note également une augmentation de la capacité d'excrétion d'ammoniaque par le rein lorsque l'hyperammoniémie est plus sévère, mais celle-ci est rapidement excédée et on observe un plafonnement de l'excrétion, bien que les niveaux d'ammoniaque et de Gln soient augmentés (Dejong, C.H. *et al.* 1993c).

Chez les patients cirrhotiques, on note également une augmentation de l'excrétion de NH_4^+ par la voie rénale proportionnelle à la diminution de la de synthèse de l'urée par le foie (Häussinger, D. *et al.* 1990).

1.2.3.4 Élimination par le cerveau

Comme il a été mentionné plus haut, on observe une élévation très marquée de l'ammoniaque plasmatique ainsi qu'une alcalose tant chez les patients que chez le rat porteur d'une APC. Dans une solution aqueuse au pH physiologique l'ammoniaque existe entre 98 et 99% sous forme protonée NH_4^+ , on en retrouve donc de 1 à 2% sous sa forme gazeuse non chargée NH_3 qui peut aisément diffuser à travers les membranes (Cooper, A.J. et Plum, F. 1987). La barrière hémato-encéphalique est environ 200 fois plus perméable pour la forme gazeuse que la forme protonée et l'équilibre entre les

deux formes est étroitement lié au pH sanguin (Raichle, M.E. et Larson, K.B. 1981). La perméabilité de la barrière hémato-encéphalique à l'ammoniaque venant du sang est fonction du pH sanguin, du pH cérébral, de la solubilité lipidique du NH_3 ainsi que du flux sanguin cérébral. Des études utilisant le traceur ^{13}N -ammoniaque ont montré que la diffusion de l'ammoniaque et sa conversion en Gln par les astrocytes est extrêmement rapide ($t_{1/2}=3\text{s}$) (Cooper, A.J.L. et Gelbard, A.S. 1988).

Une étude récente utilisant le PET a démontré que le passage de l'ammoniaque à travers la barrière hémato-encéphalique ainsi que son métabolisme sont augmentés chez les patients cirrhotiques (Lockwood, A.H. *et al.* 1991b). Ces auteurs estiment qu'environ 20% de cette augmentation de perméabilité pourrait être causée par l'alcalose métabolique observée chez les cirrhotiques. Suite à une APC chez le rat une augmentation de l'extraction de l'ammoniaque du plasma vers le cerveau a également été notée 48h (Dejong, C.H. *et al.* 1992), 7 et 14 jours (Dejong, C.H. *et al.* 1993a) ainsi que 8 semaines après la chirurgie (Gjedde, A. *et al.* 1978).

Le cerveau étant dépourvu d'un cycle de l'urée fonctionnel, celui-ci ne peut se débarrasser de l'ammoniaque que via la synthèse de Gln par les réactions suivantes.

- 1) 2-cétoglutarate + NH_3 + NADH
- 2) Glutamate + NH_3 + ATP

L'enzyme glutamate déshydrogénase (GDH), presque ubiquitaire, catalyse la première réaction alors que la GS, qui catalyse la deuxième réaction, se retrouve presque exclusivement dans le cytoplasme des astrocytes (Martinez-Hernandez, A. *et al.* 1977; Shank, R.P. *et al.* 1993).

Le principal point en faveur d'une telle détoxification de l'ammoniaque via la synthèse de Gln est qu'un bolus d'ammoniaque marqué au ^{13}N est presque exclusivement incorporé à la Gln dans le groupement amide tant chez l'humain que chez des rats normaux ou avec une APC (Cooper, A.J. *et al.* 1979; Lockwood, A.H. *et al.* 1979). De plus, la différence artério-veineuse cérébrale pour la Gln est augmentée chez les rats suite à une APC, laissant penser que le cerveau arrive à se débarrasser d'une partie de l'ammoniaque en libérant de la Gln dans le flux veineux (Duffy, T.E. *et al.* 1983).

Cette détoxification de l'ammoniaque via la synthèse de Gln a donné lieu à la formulation de plusieurs hypothèses voulant que le métabolisme normal des neurotransmetteurs et/ou de leurs intermédiaires soit altéré. Cet aspect sera discuté plus loin dans la section traitant des neurotransmetteurs.

1.2.4 Effets directs de l'ammoniaque sur la fonction cérébrale

Des concentrations élevées d'ammoniaque peuvent affecter le système nerveux central de manière directe en inhibant ou activant différents mécanismes. Par exemple, des concentrations d'ammoniaque de l'ordre du millimolaire inhibent le potentiel post-synaptique inhibiteur dans différentes régions cérébrales en bloquant le retrait du chlore du neurone post-synaptique (Raabe, W.A. 1989), rendant le neurotransmetteur inhibiteur inefficace.

Des concentrations d'ammoniaque de l'ordre du millimolaire ont également un effet inhibiteur sur le potentiel excitateur post-synaptique et présynaptique. Effectivement, la neurotransmission glutamatergique des collatérales de Schaffer vers la corne d'Ammon (CA1) de l'hippocampe est inhibée de manière réversible par l'ammoniaque (Szerb, J.C. et Butterworth, R.F. 1992).

De plus, la décharge des neurones de la région CA1 initiée par l'application iontophorétique de Glu est inhibée par l'ammoniaque, suggérant que l'ammoniaque amoindrit la transmission synaptique excitatrice par un effet post-synaptique direct (Fan, P. *et al.* 1990).

1.2.5 Effet de l'ammoniaque sur le métabolisme énergétique

La GS étant une enzyme dépendante de l'ATP, on pourrait s'attendre à ce que la détoxification de l'ammoniaque par les astrocytes augmente leurs besoins énergétiques. Une hypothèse avancée il y a longtemps par Bessman et Bessman (1955) était à l'effet que les concentrations anormalement élevées d'ammoniaque induisent la synthèse de Gln à un rythme tel que certains intermédiaires du cycle de Krebs comme le 2-cétoglutarate seraient épuisés conduisant à un déficit énergétique et éventuellement au coma (Bessman, S.P. et Bessman, A.N. 1955). Par contre, une étude sur des rats ayant une APC auxquels on a injecté une dose massive d'ammoniaque, a montré que les symptômes de l'EPS surviennent bien avant un déficit énergétique cérébral (Hindfelt, B. *et al.* 1977).

Il a été démontré que l' α -cétoglutarate déshydrogénase (α -KGDH), une enzyme clé du cycle de Krebs, est inhibée par des concentrations d'ammoniaque comparables à celles qui sont retrouvées dans l'EPS chez l'humain ou le modèle animal (Lai, J.C. et Cooper, A.J. 1986). Également, il semble qu'*in vitro* l'ammoniaque active la phosphofructokinase, une enzyme clé de la glycolyse (Lowry, O.H. et Passonneau, J.V. 1966). De plus, une baisse de l'efficacité de la navette malate-aspartate chargée de transporter les équivalents réductionnels (NADH) à travers les membranes mitochondriales a

été suggéré (Figure 1.2) (Hindfelt, B. *et al.* 1977). Le NADH ne pouvant traverser les membranes mitochondriales, c'est via le malate qu'il est transporté à l'intérieur des mitochondries pour être utilisé dans le cycle de Krebs (Williamson, J.R. *et al.* 1971). Il a été proposé que l'inhibition du fonctionnement de la navette malate-aspartate vient du fait que le Glu est moins disponible parce qu'il est utilisé pour la détoxification de l'ammoniaque par sa conversion en Gln (Figure 1.2).

À la lumière de ces données, on a proposé l'hypothèse suivante qui, parmi d'autres, semble une des plus plausibles. L'ammoniaque provoque à la fois la stimulation de la glycolyse via la stimulation de la phosphofructokinase et en même temps une chute de l'activité du cycle de Krebs par l'inhibition de l' α -KGDH et l'inhibition de la navette malate-aspartate (Figure 1.2) (Cooper, J.L. 1996). Comme la chaîne mitochondriale de transport des électrons n'arrive plus à suivre le rythme de la glycolyse, une stimulation du métabolisme anaérobie s'ensuit avec l'augmentation concomitante du lactate et du ratio NADH/NAD⁺ cytosolique.

Il semble, en effet, que le lactate augmente tant dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) de patients encéphalopathes (Yao, H. *et al.* 1987) que le LCR (Therrien, G. *et al.* 1991) ou le tissu cérébral (Hindfelt, B. *et al.* 1977) de rats ayant une APC suivie d'injection d'acétate d'ammonium. Dans le cas d'EH fulminante induite par l'injection de CCl₄, il a été démontré que le lactate augmente d'environ le double sans aucun changement tant au niveau du pH que du métabolisme énergétique mesuré par ³¹P-RMN (Bates, T.E. *et al.* 1989). Toutefois, ces changements surviennent à des concentrations d'ammoniaque cérébrales extrêmement élevées et les perturbations du métabolisme énergétique cérébral lors d'une hyperammoniémie modérée ne

sont pas assez grandes pour influencer sensiblement la synthèse d'ATP (Cooper, J.L. 1996).

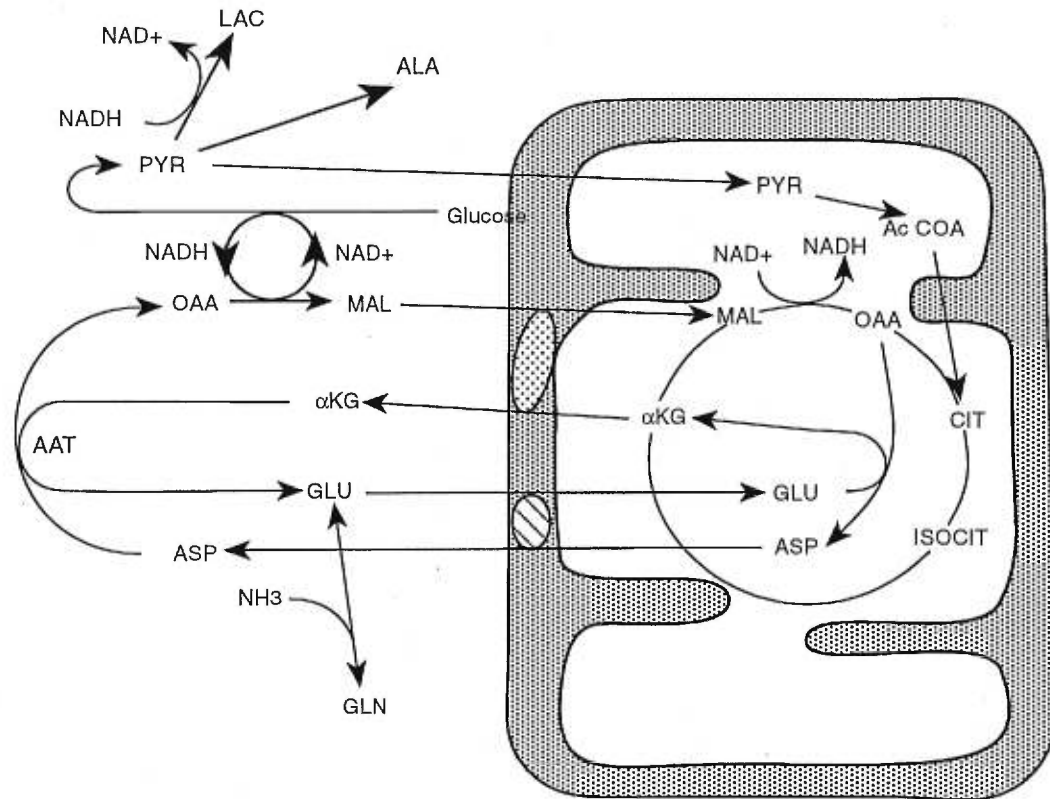


Figure 1.2. Relations entre le cycle de Krebs et la navette malate-aspartate transportant les équivalents réductionnels de part et d'autre des membranes mitochondriales.

AAT: aspartate amino transférase, ALA: alanine, ASP: aspartate, AcCOA: acétyl coenzyme A, CIT: citrate, GLN: glutamine, GLU: glutamate, ISOCIT: iso-citrate, α KG: α -cétoglutarate, LAC: lactate, MAL: malate, NADH: nicotinamide adénine dinucléotide réduit, NAD^+ : nicotinamide adénine dinucléotide oxydé, OAA: oxaloacétate, PYR: pyruvate.

Dans le même ordre d'idée, la production de CO₂ par des cultures d'astrocytes exposées à des concentrations d'ammoniaque équivalentes à celles retrouvées lors d'une EPS (1 à 3 mM) sont significativement diminuées (Yu, A.C. *et al.* 1984).

Certains chercheurs contestent l'hypothèse voulant que l'EPS soit engendrée par un déficit énergétique entre autre parce que le cerveau a la capacité de synthétiser les intermédiaires du cycle de Krebs via des réactions anaplérotiques qui peuvent fournir des intermédiaires au cycle par la carboxylation du pyruvate soit en oxaloacétate ou en malate (Hawkins, R.A. et Mans, A.M. 1989).

Il apparaît que les astrocytes en culture augmentent leur production de glycogène lorsqu'on les met en présence de Glu (1 mM) ou de MSO (1 mM), cette hausse étant abolie par des inhibiteurs de la recapture du Glu (Swanson, R.A. *et al.* 1990). Ce glycogène étant presque uniquement formé à partir de glucose, ces auteurs suggèrent que lors de la recapture rapide du Glu extracellulaire les besoins en glucose chutent car le cycle de Krebs utilise alors le Glu comme source d'ATP et stocke le glucose sous forme de glycogène.

Une étude récente utilisant la spectroscopie par RMN a montré que le Glu peut être utilisé par les astrocytes en culture comme source d'énergie en fournissant certains intermédiaires du cycle de Krebs (McKenna, M.C. *et al.* 1996). Cette même étude a démontré qu'à des concentrations de Glu de 0.1 mM, celui-ci était métabolisé en Gln à 85% et qu'à des niveaux de 0.2 à 0.5 mM il était également métabolisé en aspartate intracellulaire et en lactate relâché dans le milieu.

Pour toutes ces raisons, de nombreuses équipes se sont intéressées au statut énergétique cérébral lors d'hyperammoniémies et en particulier chez des rats ayant une APC.

1.2.5.1 Méthode du ^{14}C -Glucose

Cette méthode implique l'injection de ^{14}C -Glucose à des rats qui peuvent être soit conscients ou anesthésiés, et qu'on peut restreindre dans leurs mouvements ou laisser libres. Chacune de ces avenues a des avantages, comme la simplicité de canulation lorsque les animaux sont anesthésiés et/ou restreints, mais peut également engendrer des biais dus au stress ou à l'anesthésie. En effet, il semble que la tubocurarine, fréquemment utilisée pour paralyser les rats en les laissant conscients, a un effet sur la pression intracrânienne ainsi que sur le taux de perfusion cérébral (Tarkkanen, L. *et al.* 1974).

Le ^{14}C -glucose est injecté de manière intraveineuse et des échantillons de sang artériel doivent être prélevés afin de pouvoir suivre la cinétique du traceur. La durée de l'expérience doit être extrêmement courte (environ une minute) afin d'éviter que le traceur ne soit métabolisé. Lorsque le délai expérimental reste court, l'accumulation de radioactivité dans le cerveau provient principalement du transport du ^{14}C -glucose reflétant ainsi l'utilisation du glucose cérébral (Hawkins, R.A. *et al.* 1985). Le tissu cérébral est ensuite récupéré rapidement et congelé afin d'être tranché pour l'exposition à un film d'autoradiographie.

L'équipe de Mans (1983) a observé une baisse généralisée de l'utilisation du glucose cérébral chez des rats entre 4 à 8 semaines suite à une APC.

L'amplitude de cette baisse n'est pas fonction du temps à l'intérieur de cet intervalle et se situe aux environs de 20% (Mans, A.M. *et al.* 1986). Ils n'ont pas observé de différence entre les animaux non restreints et les animaux paralysés par la tubocurarine et ventilés mécaniquement (Mans, A.M. *et al.* 1983).

Dans une étude portant principalement sur la normalisation de l'utilisation du glucose par le cerveau suite à l'administration de glucose et/ou d'acides aminés par voie intraveineuse ou *per os*, on a également montré que l'utilisation locale du glucose cérébral (ULGC) était diminuée d'environ 25 à 30% chez les rats ayant une APC (Mans, A.M. *et al.* 1986). Dans cette même étude, on a montré que l'administration de glucose et/ou d'acides aminés réduisait la concentration de Gln tant plasmatique que cérébrale, quoique suite à cette baisse il n'y avait pas de normalisation de l'utilisation du glucose cérébral. Ils concluent donc qu'il n'y a pas de lien direct entre la baisse d'utilisation du glucose et la quantité de Gln (ou d'ammoniaque, car ils considèrent que la concentration de Gln est le reflet de la concentration d'ammoniaque).

1.2.5.2 Méthode du ^{14}C -Désoxyglucose

Pareillement aux études utilisant le ^{14}C -Glucose, cette technique implique l'injection de traceur à des animaux qu'on peut anesthésier ou laisser conscients, et qu'on peut restreindre dans leurs mouvements ou laisser libres. Mais contrairement à la méthode du ^{14}C -Glucose, le désoxyglucose ne peut être utilisé pour la glycolyse et un délai expérimental plus long est possible. Comme précédemment, son transport est le reflet direct de l'utilisation du

glucose cérébral.

Chez des rats post-APC de moins de quatre semaines l'ULGC est inchangée dans la plupart des régions mais abaissée dans le thalamus, le cortex frontal et pariétal (Cruz, N.F. et Duffy, T.E. 1983). Dans cette même étude, quatre semaines après l'opération, aucun changement n'a été noté sauf au niveau du cortex pariétal et de la matière blanche sous-corticale. Ce n'est qu'après 8 semaines que cette équipe a trouvé une hausse dans 13 des 36 structures étudiées. Une augmentation a également été notée 12 semaines après l'opération dans 25 des 36 régions étudiées (Cruz, N.F. et Duffy, T.E. 1983). Par contre, ils n'ont utilisé qu'un groupe d'animaux contrôles appariés avec les APC pour le poids au moment de l'expérience, sans que ceux-ci aient subi une laparotomie. De plus, ils n'ont pas observé d'augmentation de poids chez les rats APC jusqu'à 12 semaines après l'opération, ce qui va à l'encontre de presque toutes les études sur ce modèle animal.

Dans une autre étude utilisant la méthode du ^{14}C désoxyglucose sur des rats anastomosés depuis 8 semaines, on a observé une augmentation significative d'ULGC dans toutes les régions, allant jusqu'à 74% dans la formation réticulée (Lockwood, A.H. *et al.* 1986). Par contre, on doit émettre des réserves quant au traitement statistique des données de cet article. Les auteurs affirment que des valeurs d'ULGC de $61.1 \pm 18.3 \mu\text{mol}/100\text{g}/\text{min}$. (contrôles) et 72.2 ± 8.3 (shunts) sont significativement différentes (test-t) avec une valeur de $p < 0.01$. Dans la deuxième partie de leur traitement statistique, ils utilisent des valeurs normalisées, c'est-à-dire que pour chaque animal ils divisent la valeur brute pour une région avec la moyenne de toutes les régions mesurées chez cet animal. Ceci a pour effet de minimiser la variation interindividuelle, mais viole le principe de l'uniformité de la variance. Lorsqu'on regarde attentivement les

données normalisées, on peut également voir qu'il y a une diminution dans beaucoup de cas chez les animaux APC alors que les données brutes montrent une augmentation. Ils concluent l'article en disant que l'ULGC est significativement augmentée dans plusieurs régions chez les rats avec APC même si les données normalisées (significativement différentes des contrôles) diminuent dans bien des cas.

Une variante de cette technique, utilisant le PET et le ^{18}F -désoxyglucose chez des patients ayant une EPS minimale, a montré qu'il y a une augmentation de l'ULGC et du flux sanguin cérébral dans le cervelet, le thalamus et le noyau caudé mais une baisse dans le cortex (Lockwood, A.H. *et al.* 1991a).

1.2.5.3 Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

Les études utilisant la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) peuvent donner beaucoup d'informations sur les concentrations relatives *in vivo* de diverses espèces chimiques suivant la méthode utilisée. La spectroscopie RMN utilisant la résonance du phosphore-31 (^{31}P -RMN) fournit des données sur l'ATP, l'ADP, le phosphate inorganique (Pi), les phosphodiesteres (PDE), les phosphomonoesters (PME) et la phosphocréatine (PCr). La spectroscopie RMN utilisant la résonance des protons (^1H -RMN) permet de quantifier beaucoup plus d'espèces chimiques. Contrairement à l'imagerie par RMN qui utilise des champs magnétiques relativement faibles (environ 1 à 2 Tesla), la spectroscopie RMN utilise de forts champs magnétiques (7 à 8 Tesla) afin de pouvoir faire la résolution entre les différents pics.

Il n'y a pas de réel consensus dans les données recueillies à l'aide de cette

méthode chez les patients, ce qui est probablement le reflet de variations dans les méthodes de localisation employées ainsi que de la faible taille et de l'hétérogénéité des populations étudiées.

Une excellente étude a été faite chez 33 patients divisés en trois groupes, c'est-à-dire a) sans signes d'encéphalopathie hépatique b) avec une encéphalopathie subclinique et c) avec une encéphalopathie bien établie, avec des mesures prises pour l'ensemble du cerveau ainsi que spécifiquement dans les noyaux gris centraux (Taylor-Robinson, S.D. *et al.* 1994a). Comparativement à des contrôles, ils ont noté une baisse significative du ratio PME/ATP et dans une moindre mesure du ratio PDE/ATP et ce tant dans le spectre non localisé (tout le cerveau) que dans le spectre au niveau des noyaux gris centraux pour toute la population de patients. Ces changements étaient corrélés avec le statut neurologique des patients surtout dans les noyaux gris centraux. Il est donc possible que ces patients aient un métabolisme altéré des phospholipides.

Ross et coll. (87) ont observé une baisse significative du Pi relativement à la PCr et à l'ATP chez huit patients souffrant d'EH, ce qu'ils ont interprété comme étant un métabolisme énergétique cérébral altéré (Ross, B.D. *et al.* 1987). Un autre groupe a rapporté une réduction du ratio ATP/ADP•Pi chez 28 patients et a conclu à une réduction du métabolisme énergétique cérébral (Barbara, L. *et al.* 1993). Par contre, une autre équipe n'a pas trouvé de changements significatifs pour le pH, la PCr ou l'ATP chez dix patients cirrhotiques et/ou encéphalopathes (Chamuleau, R.A.F.M. *et al.* 1991).

Une étude utilisant conjointement la ^{31}P -RMN et la ^1H -RMN chez un modèle animal d'EH fulminante a démontré une augmentation très nette de Gln et du lactate en même temps qu'une baisse du Glu, mais sans changement au

niveau du métabolisme énergétique cérébral ou du pH intracellulaire (Bates, T.E. *et al.* 1989). La résolution de la Gln et du Glu dans cette étude a été possible grâce à l'utilisation d'un champ magnétique de 8.5 Tesla. De manière similaire, chez les animaux avec une ischémie hépatique aiguë induite avec une APC suivie de la ligature de l'artère hépatique, le métabolisme énergétique tel que mesuré par ^{31}P -RMN n'est pas réduit avant un coma profond (Deutz, N.E. *et al.* 1988). Cette étude a également montré une forte augmentation de la concentration de Gln cérébrale qui est significativement corrélée avec l'ammoniaque plasmatique.

Certaines études utilisant la spectroscopie par RMN des protons (^1H -RMN) ont montré que le pic correspondant au myo-inositol est abaissé jusqu'à 50% chez les patients encéphalopathes (Kreis, R. *et al.* 1991; Kreis, R. *et al.* 1992). Le myo-inositol est un métabolite plutôt mineur du métabolisme cérébral des glucides, mais on croit qu'il pourrait être impliqué dans l'osmorégulation des cellules. Ces auteurs hésitent toutefois à tirer des conclusions étant donné que le spectre du myo-inositol est en partie superposé à celui de la glycine et qu'il est extrêmement ardu de les résoudre particulièrement avec un champ magnétique de 1.5 Tesla.

Une autre étude utilisant des fréquences légèrement différentes ne permettant pas de distinguer clairement le myo-inositol mais augmentant la résolution dans les autres régions du spectre, a montré qu'il existe des différences au niveau de la choline et du pic composé du Glu et de la Gln (Glx) chez des patients encéphalopathes (Taylor-Robinson, S.D. *et al.* 1994b). Ils ont trouvé une augmentation du ratio Glx/créatine et une baisse du ratio choline/créatine dans les cortex frontal et occipital et dans les noyaux gris centraux qui reflètent bien le statut neurologique de ces patients. Cette baisse du myo-inositol et

cette augmentation de Glx s'amenuisent lorsque ces patients subissent une transplantation hépatique (Ross, B.D. *et al.* 1995).

Par contre, on est en droit de se demander si de tels changements au niveau du myo-inositol ont un lien causal avec l'EH ou s'ils ne sont que le reflet d'un métabolisme hépatique altéré des lipides (HDL, LDL et VLDL) qui induirait des changements au niveau du métabolisme membranaire.

En conclusion, on peut dire que la majorité de ces études a montré que les changements au niveau du métabolisme énergétique cérébral chez les patients encéphalopathes, lorsqu'ils sont présents, sont de faible envergure. On ne peut observer de chute réelle des niveaux d'ATP qu'au stade de coma.

1.2.5.4 Taux d'utilisation d'oxygène cérébral

Le taux d'utilisation d'oxygène cérébral ($CMRO_2$) est intimement lié au métabolisme énergétique et est le reflet de l'utilisation du glucose cérébral. Les premières mesures de $CMRO_2$ chez les patients cirrhotiques ont montré que l'utilisation de l'oxygène cérébral décroît avec la sévérité de l'atteinte neurologique, malgré certaines différences probablement dues à la classification des groupes de patients (Fazekas, J.F. *et al.* 1956; Posner, J.B. et Plum, F. 1960).

Chez des rats post-APC, on ne note pas de changements significatifs de $CMRO_2$ (Gjedde, A. *et al.* 1978). Par contre, l'injection d'une dose non-léthale d'ammoniaque (2.6 mmol/Kg) à ces mêmes rats provoque une chute de $CMRO_2$ et de la perfusion cérébrale, ce qui suggère que le métabolisme cérébral des animaux ayant une APC s'adapte à l'augmentation chronique

d'ammoniaque mais peut difficilement répondre à une surcharge (Gjedde, A. *et al.* 1978).

1.2.5.5 Flux sanguin cérébral

Le débit sanguin cérébral est également lié intimement au métabolisme cérébral. Chez les patients présentant une EPS on observe une réduction significative du débit sanguin cérébral au niveau du cortex (Dam, M. *et al.* 1998; Lockwood, A.H. *et al.* 1991a; O'Carroll, R.E. *et al.* 1991; Rodriguez, G. *et al.* 1987; Trzepacz, P.T. *et al.* 1994), des noyaux gris de la base (Trzepacz, P.T. *et al.* 1994) et dans le cerveau entier (Fazekas, J.F. *et al.* 1956). Cependant, au niveau des noyaux gris de la base deux équipes ont également trouvé des augmentations du flux sanguin cérébral (Lockwood, A.H. *et al.* 1991a; O'Carroll, R.E. *et al.* 1991).

Il est intéressant de noter que la transplantation hépatique rétablit le flux sanguin cérébral, abaissé dans le cortex des patients cirrhotiques, à des niveaux équivalents à ceux de sujets normaux (Dam, M. *et al.* 1998).

1.2.6 Effet de l'ammoniaque sur le système de neurotransmission glutamatergique

Outre son implication dans le métabolisme cérébral, le Glu participe directement et indirectement à la neurotransmission car en plus d'être un neurotransmetteur excitateur il est le précurseur de neurotransmetteurs comme l'aspartate (excitateur) et l'acide gamma amino butyrique (GABA, inhibiteur) (Erecinska, M. et Silver, I.A. 1990; Fonnum, F. 1984). Des

modifications induites par l'ammoniaque au niveau de son métabolisme, sa disponibilité ou de son transport pourraient avoir des répercussions sur la fonction cérébrale (Rao, V.L. *et al.* 1992). Les étapes impliquées dans la neurotransmission pouvant être l'objet de telles modifications sont: 1) synthèse du neurotransmetteur incluant la disponibilité des précurseurs et des cofacteurs, 2) transport du neurotransmetteur de son site de synthèse vers le site de libération (vésicules synaptiques), 3) libération du neurotransmetteur, 4) action post-synaptique du neurotransmetteur, 5) inactivation du neurotransmetteurs (recapture dans le cas du Glu). Dans le cas du Glu, l'ammoniaque peut influencer un certain nombre de ces étapes présentées d'une manière simplifiée dans la figure 1.3.

Normalement, dans le cerveau le Glu est présent dans deux compartiments principaux, c'est-à-dire dans les neurones glutamatergiques et les astrocytes. Le Glu à l'intérieur des astrocytes se trouve principalement dans un réservoir de nature métabolique servant, entre autres, à la synthèse de Gln (Rao, V.L. *et al.* 1992). Chez les neurones on retrouve à la fois un réservoir métabolique et un réservoir libérable au niveau des synapses pour assurer la neurotransmission.

Dans le bouton synaptique les réservoirs libérables et métaboliques sont synthétisés à partir de précurseurs différents (Balazs, R. *et al.* 1973; Van den Berg, C.J. *et al.* 1975). La synthèse du bassin de neurotransmetteur se fait à partir de la désamination de la Gln (Bradford, H.F. *et al.* 1978) ainsi que par la transamination ou la désamination de l' α -cétoglutarate (Fonnum, F. 1984; Hamberger, A.C. *et al.* 1979; Peng, L.A. *et al.* 1991), bien que cette dernière réaction ne semble jouer qu'un rôle secondaire dans la production de Glu libérable (Yudkoff, M. *et al.* 1991). Il a été clairement démontré que l'inhibition

de la GS astrocytaire (par du MSO) provoque une réduction substantielle du Glu dans les vésicules synaptiques neuronales et que par conséquent, la principale source de Gln pour la synthèse de ce neurotransmetteur provient des astrocytes (Laake, J.H. *et al.* 1995).

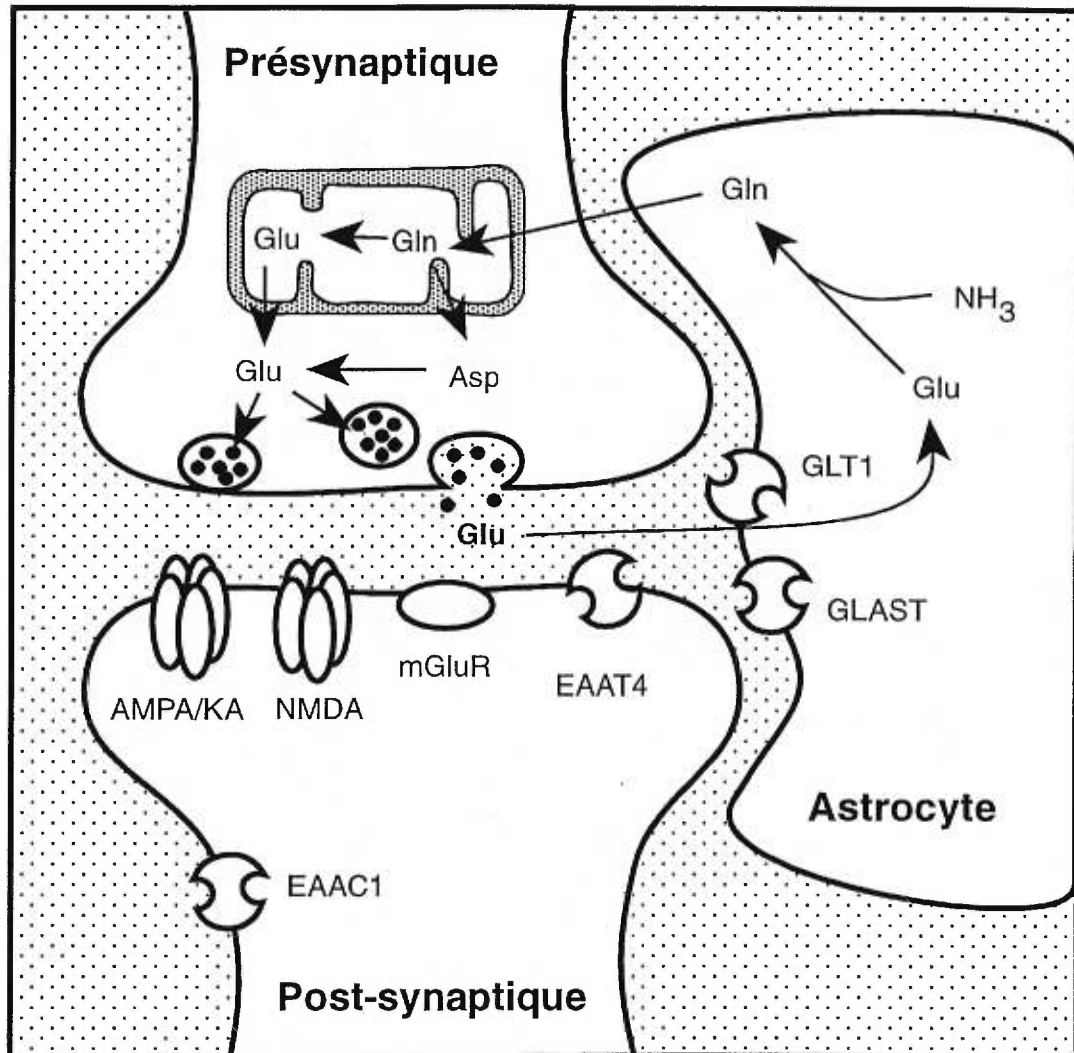


Figure 1.3 Aperçu des principales composantes d'une synapse glutamatergique.

1.2.6.1 Le cycle glutamate-glutamine

En condition physiologique normale, on observe entre les neurones et les astrocytes ce que l'on nomme désormais le cycle glutamate-glutamine (Figure 1.3). Dans un premier temps, les astrocytes capturent le Glu libéré par les neurones et le transforme en Gln via la GS. Cette Gln est ensuite transportée dans l'espace extracellulaire par un antiporteur qui l'échange contre un acide aminé neutre (Brookes, N. 1992a). Finalement, suite à sa capture par un neurone glutamatergique, la Gln est transformée en Glu par la glutaminase, permettant de pourvoir aux besoins de la synapse en neurotransmetteur (Cooper, A.J. et Plum, F. 1987). En appui à cette thèse, une étude récente combinant des techniques d'immunohistochimie et de microscopie électronique a démontré hors de tout doute que le Glu extracellulaire est capturé et transformé en Gln qui, une fois reprise par les neurones, est incorporée dans le compartiment correspondant au Glu libérable par la synapse (Laake, J.H. *et al.* 1995).

Une multitude d'études tant chez les cirrhotiques (Lavoie, J. *et al.* 1987b), le rat (Cooper, A.J. *et al.* 1985; Giguère, J.F. et Butterworth, R.F. 1984; Therrien, G. et Butterworth, R.F. 1991; Williams, A.H. *et al.* 1972), le chat (Raabe, W. et Onstad, G. 1985) et le cochon (Diemer, N.H. et Tonnesen, K. 1977) ont montré que l'APC provoque une augmentation cérébrale de Gln. Il semble que cette augmentation de la synthèse de Gln chez les rats APC est différente suivant les régions cérébrales étudiées (Butterworth, R.F. et Giguère, J.F. 1984). L'injection i.v. d'acétate d'ammonium à des rats porteurs d'une APC n'augmente pas davantage la synthèse de Gln au niveau cortical, contrairement au tronc cérébral où l'on note une plus grande production de Gln (Butterworth, R.F. *et al.* 1988). Ceci pourrait expliquer l'augmentation

significativement plus grande de l'ammoniaque corticale (5 mM) comparativement au tronc cérébral (3 mM) (Butterworth, R.F. et al. 1988).

Par contre, l'APC et hyperammoniémie qui en résulte n'induisent pas une augmentation de l'activité de la GS. Il semble que l'activité de la GS n'est pas augmentée dans le cerveau entier de rats jusqu'à 12 semaines après une APC (Cooper, A.J. et al. 1985; Girard, G. et Butterworth, R.F. 1992). Elle peut même être diminuée dans le cortex (15%), dans l'hippocampe (25%), dans le cervelet (29%) mais reste inchangée dans le tronc cérébral de rats 4 semaines après une APC (Butterworth, R.F. et al. 1988; Girard, G. et al. 1993). Dans le tissu de patients cirrhotiques morts d'un coma hépatique, on note également une baisse de l'ordre de 25% de l'activité de la GS dans le noyau caudé (Lavoie, J. et al. 1987a). La synthèse de Gln par le cerveau reste pratiquement inchangée chez des animaux ayant une APC à qui l'on injecte un bolus d'ammoniaque, contrairement à des individus normaux où l'on note une augmentation de celle-ci (Therrien, G. et Butterworth, R.F. 1991; Ukida, M. et al. 1988). Ceci tend à démontrer, une fois de plus, que la capacité de synthèse de la Gln est limitée dans le cerveau d'animaux hyperammonémiques. Toutes ces données contrastent avec l'augmentation bien établie de l'activité de la GS par l'ammoniaque à des concentrations physiologiques normales (Waniewski, R.A. 1992).

Deux hypothèses pourraient expliquer le manque d'induction de la GS par l'ammoniaque : a) que les altérations astrocytaires comme le gonflement et l'astrocytose Alzheimer de type II empêchent l'induction de la GS, b) ceci est le fruit d'une inhibition de la GS par son produit de synthèse, c'est-à-dire la Gln. Une étude *in vitro* a déjà montré que la GS était effectivement sous le contrôle étroit de la Gln, ce qui milite en faveur de la deuxième hypothèse

(Patel, A.J. et al. 1986)

Il semble donc que le cerveau soit limité dans sa capacité d'altérer les niveaux de plusieurs enzymes reliés au métabolisme du Glu et de l'ammoniaque lorsque exposé à une hyperammoniémie chronique (Cooper, A.J. et al. 1985). Il serait alors particulièrement sensible à toute augmentation d'ammoniaque plasmatique et/ou cérébral. Les mécanismes de régulation de la GS semblent être nombreux et peuvent agir à plusieurs niveaux. Par exemple, l'activité de la GS peut être induite en culture (150%) par un agoniste des récepteurs pour le Glu lié aux protéines G (métabotropiques), mais par aucun autre type de récepteur glutamatergique (Miller, S. et al. 1992). Il est également clair que la synthèse de la GS est modulée par les glucocorticoïdes comme l'hydrocortisone et que son activité augmente avec le pH (Brookes, N. 1992b).

Des concentrations d'ammoniaque au-dessus de 1 mM inhibent la glutaminase neuronale (PAG), ce qui pourrait jouer un rôle dans la chute de Glu cérébral observée ainsi que les concentrations élevées de Gln (Kvamme, E. et Lenda, K. 1982; Matheson, D.F. et Van den Berg, C.J. 1975). Rappelons que le passage du Glu du plasma vers le cerveau est pratiquement inexistant car la barrière hémato-encéphalique y est imperméable (Marcaida, G. et al. 1995).

1.2.6.2 Récepteurs canaux ioniques

On distingue trois sortes de récepteurs canaux ioniques laissant passer les cations qui peuvent être activés par le Glu. À l'origine, les différentes classes de ces récepteurs ont été nommées selon les agonistes ou antagonistes qui les activent ou les inhibent de manière raisonnablement spécifique. Comme

le N-méthyl-D-aspartate (NMDA), l'-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolo-propionate (AMPA) et le kainate. Ces trois classes de récepteurs définies de manière fonctionnelle sont composées de quatre ou de cinq sous-unités qui sont elles-mêmes codées par des familles de gènes distinctes (Figure 1.4). On compte à l'heure actuelle six familles de gènes codant pour différentes sous-unités des récepteurs canaux. À l'intérieur d'une même famille de gènes, on observe au moins 80% d'homologie au niveau des acides aminés alors qu'entre les familles on ne retrouve que 40 à 50% d'homologie ou moins (Dingledine, R. et McBain, C.J. 1999). Une particularité de ces récepteurs vient du fait que chaque combinaison de sous-unité forme un canal ionique ayant des propriétés différentes, laissant présager qu'il existe une très grande diversité *in vivo*.

1.2.6.2.1 Récepteurs pour le N-méthyl-D-aspartate (NMDA):

Les récepteurs NMDA forment des canaux ioniques laissant passer le Na^+ et le Ca^{2+} . On les trouve surtout à la surface des neurones au niveau des synapses alors que les astrocytes en sont généralement dépourvus (Wyllie, D.J. et al. 1991) quoique certains rapports montrent qu'il pourrait y avoir des récepteurs NMDA fonctionnels sur les astrocytes (Gallo, V. et Russell, J.T. 1995).

Ces canaux se composent de cinq sous-unités dont la composition des sous-unités peut varier d'une région cérébrale à une autre et pouvant être modulée de manière considérable. En effet, on compte aujourd'hui au moins 3 familles de sous-unités codées par de nombreux gènes qui peuvent être exprimés de manière presque ubiquitaire (NR1) ou spécifiquement d'une région à l'autre

(NR2 A à D et NR3A). Les ARNm de ces gènes peuvent à leur tour subir un épissage alternatif ou une réédition, créant ainsi des sous-unités différentes et en bout de ligne des récepteurs ayant des caractéristiques différentes. Ces mécanismes permettent la production de quatre à huit ARNm matures différents pour chacun des 16 gènes connus à l'heure actuelle codant pour les récepteurs ioniques glutamatergiques (Figure 1.4). Donc, potentiellement les neurones ont la capacité de construire un nombre considérable de récepteurs différents leur donnant ainsi une flexibilité étonnante (Dingledine, R. et McBain, C.J. 1999).

Les récepteurs NMDA possèdent également au moins six sites de liaison pour des composés endogènes qui permettent de moduler la probabilité d'ouverture du canal. Ils se composent de deux sites de liaison agonistes (un pour le Glu ou l'aspartate et un autre pour la glycine), d'un site régulateur se liant aux polyamines (activateur) et de trois sites distincts pour le Mg^{2+} , le Zn^{2+} et le H^+ (inhibiteurs) (Figure 1.5). Il est intéressant de noter que ces mécanismes interagissent entre eux. Par exemple, l'inhibition de l'ouverture du canal par le pH (complète à un pH de 6.0, intermédiaire à 7.4 et minimale aux pH plus élevés) peut être partiellement levée par l'activation d'un site pour les polyamines (Traynelis, S.F. *et al.* 1995). Par contre, ces mêmes polyamines à des concentrations élevées produisent une inhibition voltage-dépendante du récepteur. En plus des mécanismes de régulation mentionnés ci-dessus, on retrouve une inactivation des récepteurs NMDA par la calmoduline, elle-même activée par l'entrée de Ca^{2+} induite par l'ouverture de ces mêmes récepteurs (Ehlers, M.D. *et al.* 1996).

Les récepteurs NMDA sont particuliers en ce sens qu'ils nécessitent la présence simultanée du Glu (ou de l'aspartate) et de la glycine pour être

activés. Dans ce cas-ci, comme ni la glycine ni le Glu ne peuvent agir seuls ils sont considérés comme des co-agonistes (Dingledine, R. et McBain, C.J. 1999). Un autre frein important à l'activation du récepteur NMDA provient du Mg^{2+} extracellulaire qui exerce un blocage voltage-dépendant du canal lorsqu'il est ouvert (Nowak, L. *et al.* 1984). On croit qu'*in vivo* ce blocage est levé grâce à la dépolarisation induite par les récepteurs AMPA ou Kainate situés à proximité.

		<u>Canaux ioniques</u>			<u>Métabotropiques</u>		
Classe	[NMDA	AMPA	Kainate	Classe I	Classe II	Classe III
		↓	↓	↓	↓	↓	↓
familles de gènes	[NR1	GluR1	GluR5	mGluR1	mGluR2	mGluR4
			GluR2	GluR6	mGluR5	mGluR3	mGluR6
		NR2A	GluR3	GluR7			mGluR7
		NR2B	GluR4				mGluR8
		NR2C		KA1			
		NR2D		KA2			
		NR3					
type de signal	[entrée de cations Na^+ ou Ca^{2+}			↑ IP_3	↓ cAMP	
					↑ Ca^{2+}		

Figure 1.4 Familles de gènes codant pour les récepteurs glutamatergiques ou les sous-unités les composants. Chacun des deux grands types de récepteurs (canaux ioniques ou métabotropiques) est subdivisé en trois classes composées elles-mêmes de nombreuses sous-unités codées par un gène qui lui est propre

Tous ces mécanismes de régulation font en sorte que les récepteurs NMDA sont parmi les récepteurs dont l'ouverture est le plus strictement régulée.

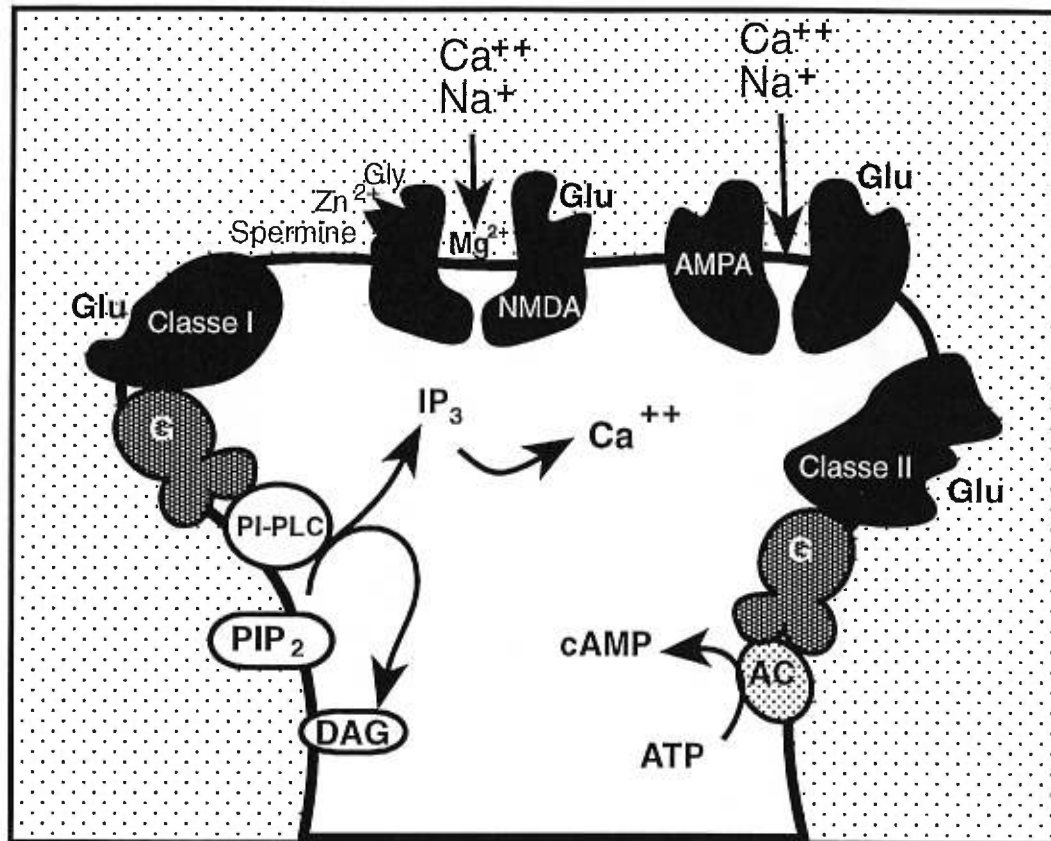


Figure 1.5 Schéma de quatre types de récepteurs pour le Glu. Deux récepteurs composés de plusieurs sous-unités et formant des canaux sont représentés, le récepteur NMDA et le récepteur AMPA. Deux classes de récepteurs métabotropiques couplés à des protéines G sont également représentés.

AC: adénylate cyclase, cAMP: adénosine monophosphate cyclique, DAG: diacylglycérol, G: protéine G, Glu: glutamate, Gly: glycine, PIP₂: phosphatidylinositol -4,5-biphosphate, PI-PLC: phospholipase C spécifique aux phosphoinositides.

Quatre semaines suite à une APC chez le rat, on note une baisse généralisée du nombre de sites de liaison pour le L-³H-Glu, pouvant être déplacé par du NMDA (Peterson, C. *et al.* 1990). Par contre, dans un modèle de dérivation portale congénitale spontanée chez le chien, aucun changement de densité ou d'affinité des récepteurs NMDA ainsi que des sites de liaison pour le L-³H-Glu n'a pu être trouvé au niveau cortical (Maddison, J.E. *et al.* 1991). Également, l'exposition aiguë de tranches de cortex de souris normales à de l'ammoniaque inhibe la dépolarisation dépendante du NMDA (Lombardi, G. *et al.* 1994).

1.2.6.2.2 Récepteurs pour l'AMPA et le Kainate.

Comme les récepteurs NMDA, les récepteurs AMPA et kainate sont composés de quatre ou cinq sous-unités dont la proportion et la composition font varier les propriétés pharmacologiques du récepteur. Ces deux types de récepteurs sont très similaires et peuvent être difficiles à distinguer dans certaines préparations (Dingledine, R. et McBain, C.J. 1999).

Comme les récepteurs NMDA, les sous-unités des récepteurs AMPA et Kainate sont codées par différentes familles de gènes (Figure 1.4). L'ARNm provenant de ces gènes peut lui aussi subir un épissage alternatif et d'autres formes d'édition pour donner de quatre à huit variantes de sous-unités pour chacun de ces gènes (Dingledine, R. et McBain, C.J. 1999). Encore une fois les cellules semblent avoir la capacité de synthétiser une gamme imposante de récepteurs AMPA et kainate ayant des caractéristiques pharmacologiques et fonctionnelles très différentes.

Chez le rat, quatre semaines suite à une APC on note une baisse de

l'immuno-marquage des sous-unités GluR2/3 des récepteurs AMPA dans les cellules de Purkinje, alors qu'il y a une augmentation des sous-unités GluR1 dans les astrocytes de Bergmann (Suárez, I. *et al.* 1997). Cependant la liaison pour le ^3H -AMPA et le ^3H -kainate est inchangée dans le cortex de rats avec une APC (Peterson, C. *et al.* 1990). Par contre, dans un modèle de dérivation portale spontanée chez le chien il y a une réduction de la densité des sites de liaison corticaux pour le ^3H -kainate ainsi qu'une perte des sites de basse affinité pour le ^3H -AMPA (Maddison, J.E. *et al.* 1991). Dans ce même modèle animal, on observe aucun changement d'affinité ou de densité des sites de liaison pour le kainate ou AMPA dans le cervelet (Maddison, J.E. *et al.* 1991), pas plus que pour le ^3H -CNQX dans le cortex (Maddison, J.E. *et al.* 1992). Ce dernier composé se lie aux récepteurs AMPA et kainate ainsi que sur les sites de liaison de la glycine (insensibles à la strychnine) des récepteurs NMDA, bien qu'il ait une affinité environ 20 fois moindre pour ces derniers (Kessler, M. *et al.* 1989). Également, l'exposition aiguë de tranches de cortex de souris normales à de l'ammoniaque inhibe la dépolarisation dépendante de l'AMPA (Lombardi, G. *et al.* 1994).

Ces incohérences sont probablement liées aux différentes techniques utilisées ainsi qu'aux différents modèles animaux observés.

1.2.6.3 Récepteurs liés aux protéines G

Les récepteurs métabotropiques s'appellent ainsi parce qu'ils sont liés à la mécanique cellulaire par des protéines G. Les récepteurs métabotropiques ont été groupés en trois classes différentes selon leur séquence en acides aminés, leur pharmacologie, et le système de second messager auquel ils

sont couplés (Figure 1.4). Les membres de chacune de ces classes partagent environ 70% d'homologie de séquence entre eux, alors qu'entre les classes on ne retrouve au mieux que 45% d'homologie (Dingledine, R. et McBain, C.J. 1999). Encore une fois, l'épissage alternatif de l'ARNm permet de générer des variantes de ces récepteurs et a été décrit pour les gènes mGluR1, mGluR4, mGluR5 et mGluR7. Les récepteurs du groupe I stimulent la phospholipase C spécifique aux phosphoinositides (PI-PLC) et la relâche de Ca^{2+} intracellulaire. L'activation de la PI-PLC mène à la formation d'inositol triphosphate (IP_3), permettant la libération de Ca^{2+} intracellulaire, et de diacylglycérol (DAG) pouvant activer la protéine kinase C (PKC). L'activation des récepteurs du groupe II et probablement du groupe III provoquent l'inhibition de l'adénylate cyclase et de la production d'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) (Dingledine, R. et McBain, C.J. 1999).

Les récepteurs métabotropiques glutamatergiques sont capables de moduler la réponse d'un grand nombre de récepteurs incluant les récepteurs AMPA, NMDA, $GABA_A$, dopamine et norépinéphrine. L'activation des récepteurs métabotropiques peut induire une potentialisation ou une inhibition suivant le mécanisme de signalisation ciblé et cette action est souvent spécifique d'un tissu ou d'une région cérébrale. (Dingledine, R. et McBain, C.J. 1999).

On a montré qu'une part importante des récepteurs métabotropiques est localisée au niveau présynaptique et qu'ils peuvent bloquer autant la transmission glutamatergique excitatrice que la transmission $GABA$ ergique inhibitrice (Dingledine, R. et McBain, C.J. 1999). Il est probable, étant donné que les trois classes de récepteurs métabotropiques inhibent les canaux calciques voltage-dépendants, que cette action inhibitrice sur la neurotransmission soit liée à l'inhibition présynaptique de ces canaux

(Takahashi, T. *et al.* 1996).

Certaines équipes ont suggéré l'implication de ce type de récepteur dans l'EPS. Ces récepteurs pourraient être impliqués dans certains processus cellulaires reliés aux modifications observées lors d'une astrocytose Alzheimer de type II. Par exemple, récemment on a démontré que l'activation de ce type de récepteur par un agoniste spécifique, l'acide trans 1-aminocyclopentane-1-3-dicarboxylique (t-ACPD), provoque un gonflement des astrocytes (Hansson, E. *et al.* 1994). Aussi, il semble que l'activation de ce type de récepteur augmente l'activité de la GS, une enzyme capitale pour la détoxification par les astrocytes de l'ammoniaque cérébrale (Miller, S. *et al.* 1992).

D'autre part, une étude récente a montré que si on expose des tranches de cortex de souris à de l'acétate d'ammonium (2 à 4 mM) on obtient une inhibition de la synthèse d'IP₃ mais aussi une augmentation de la synthèse d'AMP cyclique suite à la stimulation des récepteurs métabotropiques (Lombardi, G. *et al.* 1994). Ceci suggère que l'ammoniaque inhibe les récepteurs métabotropiques de la classe I mais stimule les récepteurs de la classe II (Figure 1.4) (Lombardi, G. *et al.* 1994).

1.2.6.4 Capture du glutamate

La transmission glutamatergique se termine par la recapture du Glu via une famille de transporteurs de haute affinité qui utilisent le gradient électrochimique du Na⁺/K⁺ comme force motrice (Gegelashvili, G. et Schousboe, A. 1998). Il est généralement admis que cette capture se produit principalement dans les astrocytes (Rothstein, J.D. *et al.* 1996). Jusqu'à présent, cinq types de transporteurs à haute affinité pour le Glu ont été clonés,

GLAST/EAAT1, GLT1/EAAT2, EAAC1/EAAT3, EAAT4 et EAAT5. Deux modèles mécanistiques ont été développés. Le premier suggère que suite à la liaison du Glu il y a, de manière séquentielle, translocation de trois ions Na^+ , un proton et du Glu chargé négativement, suivi par le contre-transport d'un ion K^+ vers l'extérieur de la cellule. Une variante de ce mécanisme propose plutôt le co-transport de deux ions Na^+ et d'une molécule de Glu suivi par la sortie d'un ion K^+ et d'un OH^- ou HCO_3^- . Dans les deux cas, il y a un gain net d'une charge positive vers l'intérieur de la cellule (Gegelashvili, G. et Schousboe, A. 1997; Zerangue, N. et Kavanaugh, M.P. 1996). La spécificité pour les substrats et la stœchiométrie de ces transporteurs restent encore controversées.

Dans le cerveau, l'ARNm codant pour EAAT4 est confiné au cervelet alors que EAAC1, GLT1 et GLAST peuvent se retrouver à la grandeur du cerveau. Toutefois, le cervelet est particulièrement riche en GLAST et GLT1 est plus abondant surtout au niveau du cortex cérébral (Gegelashvili, G. et Schousboe, A. 1998). EAAC1 se caractérise par une distribution plus uniforme à travers le cerveau quoique certaines études ont montré qu'il est plus abondant dans le cortex (Rothstein, J.D. *et al.* 1994).

La distribution de ces transporteurs entre les différents types cellulaires est davantage controversée. À la fois les neurones et les astrocytes ont une grande capacité de transport pour le Glu (Drejer, J. *et al.* 1982; Hertz, L. 1979), quoique les astrocytes semblent être le site majeur de clairance (capture et biotransformation) dans les régions cérébrales ayant une activité glutamatergique importante (Rothstein, J.D. *et al.* 1996; Schousboe, A. 1981; Schousboe, A. et Divac, I. 1979). La difficulté à discerner la localisation cellulaire des différents types de transporteurs vient de la non-spécificité de

certaines méthodes d'étude. En effet, il a été proposé qu'une part substantielle du transport observé dans les préparations de synaptosomes provienne d'une contamination issue des membranes gliales (Danbolt, N.C. *et al.* 1992). De plus, les cellules en culture arborent des types différents de transporteurs par rapport aux cellules *in vivo* et la technique de culture utilisée a une grande influence sur leur expression (Gegelashvili, G. et Schousboe, A. 1998).

À l'aide d'une variété d'anticorps et de différentes techniques immunohistochimiques, GLT1 et GLAST ont été détectés exclusivement dans les astrocytes (Danbolt, N.C. *et al.* 1992; Lehre, K.P. *et al.* 1995; Levy, L.M. *et al.* 1993). Par contre, des études montrent que ces transporteurs, apparemment gliaux, peuvent être exprimés dans les neurones dans certaines circonstances (Rothstein, J.D. *et al.* 1994). Certains neurones du cervelet (incluant des cellules non-glutamatergiques) expriment GLAST (Rothstein, J.D. *et al.* 1994) alors que l'ARNm de GLT1 se retrouve dans un sous-groupe de neurones de l'hippocampe (Torp, R. *et al.* 1994).

On peut dire que dans le cerveau EAAC1 est un transporteur spécifique des neurones (Björas, M. *et al.* 1996; Kanai, Y. *et al.* 1994; Rothstein, J.D. *et al.* 1994; Torp, R. *et al.* 1994). Il est exprimé fortement, tant dans certains neurones glutamatergiques que non-glutamatergiques, alors que parfois on ne peut en trouver la trace dans ces mêmes types de cellules (Rothstein, J.D. *et al.* 1994; Torp, R. *et al.* 1994). Ces données font en sorte que l'on peut considérer EAAC1 comme un marqueur de neurones mais pas de synapses glutamatergiques (Gegelashvili, G. et Schousboe, A. 1998).

EAAT4 et EAAT5, deux types de transporteurs récemment clonés, semblent être liés à une conductance pour le chlore (Arriza, J.L. *et al.* 1997; Fairman,

W.A. *et al.* 1995). EAAT4 est exprimé de manière post-synaptique dans les dendrites des cellules de Purkinje du cervelet (Yamada, K. *et al.* 1996) et EAAT5 a été cloné à partir de la rétine (Arriza, J.L. *et al.* 1997).

La capture du Glu dans le contexte de l'EPS a été évaluée à l'aide de différentes méthodes et a donné des résultats différents selon que l'exposition était aiguë ou chronique. Ainsi, la capture de ^3H -Glu est inchangée autant sur des tranches cérébrales que des préparations de synaptosomes provenant de rats ligaturés au niveau de la veine porte ou des voies biliaires, des modèles animaux chroniques, et ce même lorsque 5 mM de chlorure d'ammonium y a été ajouté (Maddison, J.E. *et al.* 1996). Cependant, un mois suite à une APC, l'immuno-marquage de GLT1/EAAT2 est augmenté dans la couche granulaire du cervelet alors que l'immuno-marquage de GLAST/EAAT1 est diminué dans la couche moléculaire (Suárez, I. *et al.* 2000).

De manière aiguë, l'ammoniaque inhibe significativement la recapture *in vitro* du Glu par des synaptosomes (Mena, E.E. et Cotman, C.W. 1985). Il est intéressant de noter que cette équipe n'a observé une inhibition qu'au niveau de la composante qui peut être stimulée par l'ion K^+ , indépendamment de la concentration des ions Na^+ . De la même manière, l'exposition de cultures d'astrocytes pendant 7 jours à des concentrations d'ammoniaque de l'ordre du millimolaire conduit à une baisse de la capture de Glu (Chan, H. et Butterworth, R. 2000; Bender, A.S. et Norenberg, M.D. 1996) et à la baisse de l'expression de GLAST/EAAT1 (Chan, H. et Butterworth, R. 2000). Dans le modèle animal d'EH aiguë on observe également une baisse de l'expression de l'ARNm (Knecht, K. *et al.* 1997; Norenberg, M.D. *et al.* 1997) et de la protéine GLT1/EAAT2 (Knecht, K. *et al.* 1997). *In vivo*, suite à l'induction d'une dégénérescence hépatique aiguë on constate un abaissement autant au

niveau de la liaison du ^3H -D-aspartate, de l'ARNm que de la protéine GLT1/EAAT2 (Knecht, K. *et al.* 1997; Norenberg, M.D. *et al.* 1997). Dans un même ordre d'idée, la baisse de la capture du Glu qui est observable dans les tranches d'hippocampe de rats normaux (Schmidt, W. *et al.* 1993; Schmidt, W. *et al.* 1990) ou d'humains morts d'un coma hépatique (Schmidt, W. *et al.* 1990), suite à l'exposition à du sérum ou du LCR venant de patients encéphalopathes, est proportionnelle à la quantité d'ammoniaque contenue dans ces échantillons.

Ces résultats mettent en évidence les différences existant entre une dégénérescence hépatique chronique ou aiguë sur les sites de capture pour le Glu et pourraient représenter une adaptation du cerveau à des niveaux accrus d'ammoniaque ou de Glu.

1.2.6.5 Libération du glutamate

De nombreuses études se sont attaquées à la question de la libération de Glu dans le cerveau de rats suite à une APC. A l'aide de la technique de la "cupule corticale", consistant à installer une cupule à la surface du cerveau afin de récolter le liquide extracellulaire, on a démontré que la concentration de Glu extracellulaire augmente suite à l'APC (Moroni, F. *et al.* 1983). Par contre, des études subséquentes utilisant la microdialyse *in vivo* n'ont pas réussi à démontrer une hausse de Glu extracellulaire dans le même modèle animal, tant au niveau du cortex que du striatum (Rao, V.L. *et al.* 1995; Tossman, U. *et al.* 1987).

L'exposition de tranches d'hippocampe à des concentrations d'ammoniaque de l'ordre du millimolaire provoque une chute de la libération de Glu induite

par le K^+ , sans altérer la libération spontanée (Hamberger, A. *et al.* 1979). Par contre, cette chute de la libération de Glu induite par le K^+ est absente si l'on répète l'expérience avec des tranches d'hippocampe provenant de rats ayant subi une APC (Hamberger, A. *et al.* 1980) Sur des synaptosomes exposés à de l'ammoniaque, la libération de Glu induite par le K^+ est également sans effet (Erecinska, M. *et al.* 1987). Cependant, la libération de Glu provoquée par stimulation électrique Ca^{2+} -dépendante (libération par les boutons terminaux) sur des tranches d'hippocampe provenant de rats ayant subi une APC est significativement augmentée (Butterworth, R.F. *et al.* 1991).

À partir de ces données sur la libération et la capture du Glu, il a été proposé que l'EPS serait la conséquence d'une altération de la circulation et/ou du métabolisme du Glu (Butterworth, R.F. 1992).

1.2.7 Effet de l'ammoniaque sur les récepteurs aux benzodiazépines de type périphérique

Chez les mammifères deux classes de récepteurs se liant aux benzodiazépines ont été identifiées: 1) un site de liaison que l'on retrouve exclusivement dans le système nerveux central sur une sous-unité des récepteurs $GABA_A$ qui constitue un canal pour le chlore situé sur les neurones, 2) un site de liaison dit "périphérique" car il a été identifié pour la première fois dans des organes tels que le cœur, le foie, les reins, les surrénales, les testicules et plus récemment le cerveau. Dans la plupart des tissus étudiés jusqu'à ce jour, les récepteurs aux benzodiazépines de type périphérique (RBTP) sont principalement localisés dans les mitochondries et semblent traverser les deux membranes en formant un point de contact entre celles-ci

(Anholt, R.R. *et al.* 1986; Antkiewicz-Michaluk, L. *et al.* 1988). Dans le cerveau, on les retrouve de façon prédominante dans les astrocytes et certaines autres cellules gliales (Bender, A.S. et Hertz, L. 1987).

On croit que le complexe formant le RBTP se compose d'un canal anionique dépendant du voltage de 32 kDa, d'un transporteur pour le nucléotide adénine de 30 kDa et de 4 à 6 protéines de 18 kDa se liant aux isoquinolines (IBP) (McEney, M.W. *et al.* 1992). Les RBTP peuvent à la fois se lier aux benzodiazépines et à une autre classe complètement différente de composés, les isoquinolines (Itzhak, Y. *et al.* 1993). L'IBP correspond aux sites de liaison d'un ligand spécifique des RBTP, le ³H-PK-11195 (une isoquinoline) tandis que le site de liaison pour les benzodiazépines (flunitrazépam, RO5-4864) a été associé au canal ionique dépendant du voltage de 32kDa (Garnier, M. *et al.* 1994). Par contre, une étude plus récente a montré que les sites de liaison pour les benzodiazépines se trouvent sur l'IBP et que l'affinité de ceux-ci pour les benzodiazépines ne dépend pas d'une association avec les autres protéines du complexe (Joseph-Liauzun, E. *et al.* 1997). On a également remarqué que l'IBP pouvait se faire phosphoryler par la protéine kinase A cytoplasmique mais par aucune autre protéine kinase et que cette kinase est sous le contrôle de l'AMPc (Whalin, M.E. *et al.* 1994).

Un certain nombre de ligands endogènes potentiels ayant un effet autant sur les sites de liaison périphériques que centraux a été identifié. L'inhibiteur de la liaison du diazépam (DBI) est un peptide ayant l'effet d'un agoniste inverse sur les sites de liaison pour les benzodiazépines situés sur les récepteurs GABA_A (Guidotti, A. *et al.* 1983) et un ligand potentiel des RBTP. Les cellules peuvent cliver ce peptide en divers fragments tels que le triakontatétraneuropeptide (TTN), l'octadécaneuropeptide (ODN) et

l'eicosapentaneuropeptide (EPN), ces peptides pouvant déplacer les benzodiazépines sur les RBTP (Bender, A.S. et Hertz, L. 1987; Guidotti, A. *et al.* 1988; Slobodyansky, E. *et al.* 1994).

La fonction précise de ces récepteurs reste encore ambiguë, cependant ils semblent être impliqués dans le transport du cholestérol vers l'espace intermembranaire des mitochondries (Krueger, K.E. et Papadopoulos, V. 1990). Ce cholestérol servant de précurseur à la synthèse de différents stéroïdes, on retrouve un grand nombre de RBTP dans les organes à fonction endocrine comme les surrénales, les testicules et dans une moins grande mesure le cerveau (Krueger, K.E. et Papadopoulos, V. 1990). La capacité de synthétiser *de novo* du cholestérol à partir de son précurseur le mévalolactone a été démontrée sur des astrocytes en co-culture avec des oligodendrocytes (Jung-Testas, I. *et al.* 1989), ce qui a donné naissance au terme "neurostéroïdes".

De nombreuses études ont montré que l'activation des RBTP stimule la synthèse, le métabolisme et/ou le transport de cholestérol par les mitochondries, autant dans les tissus périphériques que dans le cerveau. Sur des cellules de Leydig en culture, les ligands spécifiques pour ces récepteurs stimulent la production de prégnénolone à partir de cholestérol, et le facteur de croissance de l'épiderme (EGF) a un effet additif sur cette stimulation contrairement à l'AMPc (Papadopoulos, V. *et al.* 1990). Les différents agonistes des RBTP provoquent une augmentation de la production de stéroïdes par des cellules tumorales de la surrénale en culture de manière dose-dépendante et directement proportionnelle à leur affinité pour le récepteur (Mukhin, A.G. *et al.* 1989). De plus, sur des lignées de gliomes en culture, l'activation des RBTP augmente la synthèse de cholestérol et de

progestérone à partir du précurseur mévalolactone (Guarneri, P. *et al.* 1992). On observe les mêmes phénomènes lorsque la stimulation est induite par le ligand endogène potentiel des RBTP, le DBI, ou ses produits de clivage (Papadopoulos, V. *et al.* 1991; Papadopoulos, V. *et al.* 1992). L'activation de ces récepteurs *in vivo* soit par des isoquinolines (benzodiazépines spécifiques pour les RBTP) ou par un fragment du DBI conduit à la modulation de la synthèse de prégnéolone cérébrale (Slobodyansky, E. *et al.* 1994).

Récemment, on a également suggéré que les RBTP pouvaient faire partie d'un complexe permettant la sortie du Ca^{2+} de la mitochondrie, participant ainsi aux signaux Ca^{2+} , mais qui serait modulé par différents facteurs tels que le statut énergétique de la mitochondrie, la production de radicaux libres ou le pH intermembranaire (Miller, R.J. 1998). Différents travaux reliant les RBTP soit au transport des porphyrines et de l'hème (Taketani, S. *et al.* 1995) ou à l'importation des précurseurs de protéines (Wright, G. et Reichenbecher, V. 1999) à l'intérieur de la mitochondrie ont également été publiés. Tout dernièrement, on a cloné et localisé dans le système nerveux central une protéine cytosolique se liant spécifiquement aux RBTP qui pourrait être une sous-unité de ce complexe ou faire partie du mécanisme d'activation (Galiegue, S. *et al.* 1999). Ces dernières découvertes promettent de jeter de la lumière sur la fonction exacte de ces récepteurs dans le système nerveux central.

De nombreuses études ont montré que dans le contexte d'une EPS, il y a une augmentation très marquée tant des niveaux de RBTP que de leur ARNm. Une étude réalisée sur du tissu cérébral provenant de patients cirrhotiques morts des suites d'une EPS a montré que les sites de liaison pour le ^3H -PK-11195 étaient augmentés de 48% dans le cortex frontal et de 25% dans

le noyau caudé (Lavoie, J. *et al.* 1990). Chez le rat 4 semaines après une APC, on note une augmentation d'environ 300% dans le cervelet, de 150% dans le cortex, de même que dans le thalamus et l'hippocampe (Giguère, J.F. *et al.* 1992). Cette augmentation est induite dans les 24 heures suivant la chirurgie dans le cortex frontal, tandis que dans le thalamus et le cervelet cette hausse ne survient que 3 et 7 jours, respectivement, suite à l'APC (Leong, D.K. *et al.* 1994). Dans ce même modèle animal, l'expression des RBTP et le nombre de sites de liaison pour le ^3H -PK11195 sont augmentés dans le cortex frontal (Desjardins, P. *et al.* 1997; Desjardins, P. *et al.* 1999; Rao, V.L. *et al.* 1994) et le rein (Desjardins, P. *et al.* 1999; Rao, V.L. *et al.* 1994) mais abaissés au niveau des testicules (Desjardins, P. *et al.* 1999; Rao, V.L. *et al.* 1994).

La quantité de DBI dans le LCR des patients encéphalopathes dépasse de cinq fois les niveaux du groupe contrôle et est proportionnelle à la sévérité de l'atteinte neurologique (Rothstein, J.D. *et al.* 1989). De la même façon, on observe une augmentation de l'ODN dans plusieurs régions cérébrales de rats ayant subi une APC, spécifiquement dans les astrocytes et les cellules non-neuronales (Butterworth, R.F. *et al.* 1991).

L'hyperammoniémie pourrait être à l'origine de cette augmentation de l'expression des RBTP, car on observe le même patron d'augmentation chez des souris hyperammoniémiques ayant une déficience congénitale en ornitine transcarbamylyase (Rao, V.L. *et al.* 1993). La seule différence notable est une hausse des sites de liaison pour le ^3H -PK-11195 dans les testicules chez ces souris, probablement due à un métabolisme hépatique normal des stéroïdes androgènes contrairement aux animaux ayant une APC.

Une hyperammoniémie aiguë semble également provoquer une augmentation du nombre de RBTP *in vivo* (Itzhak, Y. *et al.* 1995) ou en culture (Itzhak, Y. *et*

Norenberg, M.D. 1994) mais de manière plus modeste que les modèles chroniques.

L'ensemble de ces données suggère que l'ammoniaque puisse avoir un effet direct sur ce type de récepteur et/ou ses ligands endogènes. Étant donné que les RBTP sont impliqués dans la synthèse des neurostéroïdes et que plusieurs de ceux-ci sont de puissants agonistes des récepteurs GABA_A (Barker, J.L. *et al.* 1986; Demirgoren, S. *et al.* 1991; Lambert, J.J. *et al.* 1995; Majewska, M.D. 1992), il a été proposé que l'augmentation de l'expression des RBTP pourrait conduire à une augmentation de l'inhibition liée aux récepteurs GABA et expliquer ainsi l'état de conscience réduit observé lors d'EPS (Desjardins, P. *et al.* 1997; Desjardins, P. *et al.* 1999).

1.3 LE VIEILLISSEMENT NORMAL DU CERVEAU

La présente étude portant sur les impacts du vieillissement sur l'évolution et la sévérité de l'EPS, nous effectuerons un bref survol des connaissances actuelles sur le vieillissement normal du cerveau. Bien entendu, l'amphe sera mise sur les mécanismes pouvant jouer un rôle dans l'évolution de l'EH.

Une des difficultés de l'étude du vieillissement normal du cerveau est justement de définir ce qui est normal lors du vieillissement. Malgré le fait qu'un âge avancé prédispose à certaines maladies (Alzheimer, Parkinson, accidents cérébraux vasculaires), il est loin d'être clair que la maladie est la conséquence inévitable du vieillissement. Certains critères doivent s'appliquer aux changements observés avec l'âge pour qu'ils puissent être considérés comme normaux. Ces changements doivent être 1) universels: c'est-à-dire, qu'ils soient observables chez n'importe quel individu qui vit

assez longtemps, 2) intrinsèques: qu'ils ne soient pas la conséquence d'aucun effet extérieur tel que la diète ou l'environnement, 3) progressifs: puisque notre compréhension actuelle du vieillissement est celle d'un phénomène progressif (Mrak, R.E. *et al.* 1997).

Les prochaines sections se proposent de faire un survol du foisonnement d'études portant sur les aspects biochimiques, morphologiques et cognitifs du vieillissement.

1.3.1 Modifications morphologiques

Les premières études sur le vieillissement du cerveau ont été effectuées au début du siècle, alors que les pathologistes de cette époque avaient remarqué des dépôts de pigments insolubles dans les sections provenant de sujets âgés (Stubel, H. 1911). Subséquemment ces pigments ont été identifiés comme étant de la lipofucine, un pigment complexe composé de résidus polymérisés de protéines et de lipides ayant subi une peroxydation (Mrak, R.E. *et al.* 1997). On ne connaît aucune fonction à ce pigment qui s'accumule progressivement dans les lysosomes des neurones et qui semble être un sous-produit des avaries normales liées à la fonction cellulaire. En effet, les animaux traités de manière à réduire la production de radicaux libres et la peroxydation accumulent peu de lipofucine dans leurs neurones, et ce indépendamment de la technique utilisée pour réduire les radicaux libres (Ma, X.Y. *et al.* 1996; Moore, W.A. *et al.* 1995).

Parmi la population neurologiquement normale, la moyenne du poids du cerveau décline graduellement après 60 ans à un rythme d'environ 2 à 3 (g)/an (Mrak, R.E. *et al.* 1997). Selon des études de RMN, ces pertes se

retrouvent surtout au niveau de la matière blanche particulièrement dans les lobes frontaux (Wickelgren, I. 1996), quoiqu'il semble y avoir des variations considérables entre les différentes régions du cerveau (Insausti, R. *et al.* 1998). Il ne faut pas perdre de vue que chez l'humain on peut difficilement faire un lien direct entre ces modestes changements de volume cérébral et un degré d'atteinte cognitive (Jellinger, K.A. 1993). Un autre facteur vient également compliquer l'interprétation des données. Il s'agit de "l'effet séculaire", qui est la tendance à l'augmentation de la masse corporelle moyenne et de la masse cérébrale moyenne dans la population au cours du 20^e siècle. Par conséquent, la masse cérébrale moyenne observée chez les individus âgés lorsque comparée à des individus jeunes décédés à la même période peut engendrer la fausse impression d'une atrophie alors que des facteurs tels que l'alimentation en bas âge en sont la cause (Mrak, R.E. *et al.* 1997).

D'ailleurs, une controverse subsiste quant à savoir si c'est l'atrophie ou la mort neuronale qui est le principal acteur dans le phénomène de la perte de volume cérébral observé lors de la sénescence. Il semble qu'à la lumière des nouvelles techniques d'imagerie et d'histologie, la thèse selon laquelle il y a une perte neuronale massive au niveau de l'hippocampe et du néocortex ne soit pas valide (Rasmussen, T. *et al.* 1996). Une atrophie des neurones, et principalement des gros neurones, provoque un biais dans les comptes neuronaux si l'on ne prend pas soin de compter autant les petits neurones que les gros, confondant ainsi atrophie et perte neuronale (Finch, C.E. 1993). Tout cela fait en sorte que les opinions divergent quant à savoir s'il y a vraiment perte massive de cellules nerveuses dans les différentes régions du cerveau avec l'âge et si les changements observés sont le fruit de techniques différentes ou même de pathologies sous-jacentes mais non diagnostiquées

(Finch, C.E. et Roth, G.S. 1999). Le consensus semble être qu'il y a une légère perte neuronale dans certaines régions bien précises, notamment dans la substance noire et l'hippocampe, mais relativement peu dans le cortex, épargnant ainsi un nombre suffisant de synapses pour éviter une atteinte des fonctions intellectuelles jusqu'à un âge assez avancé (Peinado, M.A. 1998). Les données d'imagerie par RMN sont inconsistantes et restent encore à ce jour sujettes à débat (Herndon, J.G. *et al.* 1998; Pfefferbaum, A. *et al.* 1999; Schuff, N. *et al.* 1999).

Au niveau glial, on observe une hyperactivité astrocytaire et une hypertrophie des astrocytes de 10 à 30% par rapport à des sujets jeunes (Finch, C.E. et Roth, G.S. 1999). L'analyse de sections histologiques montre qu'il n'y a pas d'augmentation du nombre d'astrocytes avec l'âge, mais qu'une augmentation de la taille du cytoplasme de ceux-ci est présente (Bjørklund, H. *et al.* 1985). Cette réponse, appelée gliose réactionnelle, est appréciable dans la matière blanche sous-corticale mais est plus variable au niveau de la matière grise chez les rongeurs (Bronson, R.T. *et al.* 1993; Mandybur, T.I. *et al.* 1989). Généralement on définit les astrocytes réactifs à l'aide de critères morphologiques, tels qu'une apparence fibreuse et une taille plus grande (Landfield, P.W. *et al.* 1978), mais également par le fait qu'ils expriment plus de GFAP (Hansen, L.A. *et al.* 1987).

Associée à l'hyperactivité des astrocytes, on note une augmentation (environ 200%) au niveau de l'expression des filaments intermédiaires (Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP) et de leur ARN messenger (ARNm) chez la plupart des mammifères (Johnson, S.J. et Finch, C.E. 1996; Morgan, T.E. *et al.* 1997). Des expériences de "nuclear run-on" sur des noyaux d'astrocytes ont montré que la capacité de synthèse de l'ARNm du GFAP n'était pas augmentée chez les

sujets âgés et que probablement des facteurs post-transcriptionnels seraient impliqués (Laping, N.J. *et al.* 1994). Il se peut qu'une dégradation moins rapide de l'ARNm ou de la protéine soit en cause, mais pour l'instant très peu de données sont disponibles à ce sujet (Finch, C.E. et Roth, G.S. 1999).

En guise de résumé, on peut dire que les changements morphologiques sont variables d'une région à l'autre et d'un individu à l'autre. On observe une atrophie des populations de gros neurones situés dans l'hippocampe et dans une moindre mesure dans le cortex, alors qu'au niveau glial on voit une hyperactivité des astrocytes et de la microglie.

1.3.2 Modifications biochimiques et moléculaires

Quelques hypothèses ont été proposées afin d'expliquer les causes et les mécanismes du vieillissement dans le contexte particulier du cerveau. Parmi ces hypothèses, on compte: **a)** l'hypothèse des radicaux libres, **b)** l'hypothèse d'une atteinte membranaire, et **c)** l'hypothèse de l'oxyde nitrique (NO). Un certain nombre de recoupements existent entre ces différentes théories et quelques auteurs ont proposé des théories "unifiées" mettant en jeu plusieurs mécanismes simultanément.

Outre ces différentes hypothèses, certains pensent qu'une atteinte du métabolisme énergétique peut contribuer au phénomène du vieillissement. Chez les individus neurologiquement normaux, les taux d'utilisation du glucose et de l'oxygène décroissent d'environ 10 à 30 % sur l'ensemble de la vie (Finch, C.E. et Roth, G.S. 1999). Ce modeste déclin est de la même envergure que les baisses au niveau de la perfusion cérébrale ou de l'atrophie du parenchyme. Toutefois, l'âge contribue beaucoup moins à la

variance globale du métabolisme cérébral que ne le font les différences interindividuelles (Finch, C.E. et Roth, G.S. 1999).

Les prochaines sections feront un bref survol de ces différentes hypothèses ainsi que de l'effet de l'âge sur le système de neurotransmission glutamatergique afin d'identifier les mécanismes pouvant être impliqués dans l'augmentation de la prévalence de l'EH chez les patients plus âgés.

1.3.2.1 L'hypothèse des radicaux libres

Cette hypothèse est basée sur l'idée que les changements au niveau des fonctions cellulaires liés à l'âge sont la conséquence soit d'une augmentation de la production ou d'une baisse de l'élimination des radicaux libres ou encore d'une combinaison des deux (Harman, D. 1996). Il semble que les dommages oxydatifs produits par les radicaux libres soient un des phénomènes les plus impliqués dans les changements observés lors de la sénescence.

Les principaux types de radicaux libres sont le superoxyde (O_2^{\bullet}), l'anion hydroxyl (OH^{\bullet}), l'oxyde nitrique (NO) et le peroxy-nitrite ($ONOO^{\bullet}$). La phosphorylation oxydative à l'intérieur des mitochondries, qui est liée à la production d'énergie, est de loin la principale source de radicaux libres mais ceux-ci peuvent également être produits par certaines enzymes (le système P450, la MAO-A et B et les oxydases à fonctions multiples)(Finch, C.E. et Roth, G.S. 1999). Ces radicaux libres peuvent induire une peroxydation des lipides et mener soit à une inactivation enzymatique, des dommages irréparables aux protéines du cytosquelette, une synthèse protéique moins efficace, une réduction de l'affinité des récepteurs et des transporteurs membranaires ou à

des mutations (Peinado, M.A. 1998). Afin de contrer ces molécules dangereuses tout un système de défense, tant enzymatique que non-enzymatique, a évolué avec le temps. On pense que ce système de défense devient de plus en plus compromis avec les années soit parce que la production de radicaux libres augmente ou qu'il existe un déclin "programmé" d'une ou plusieurs composantes de ce système (Lynch, M.A. 1998). Le tissu nerveux est particulièrement vulnérable aux attaques des radicaux libres car il est le siège d'une intense consommation d'oxygène couplée à de modestes défenses antioxydantes (Halliwell, B. 1992). On y retrouve également une grande quantité de fer permettant certaines réactions avec les radicaux libres (Benkovic, S.A. et Connor, J.R. 1993) et une grande concentration d'acides gras polyinsaturés qui sont particulièrement susceptibles à l'attaque des radicaux libres.

Chez la majorité des mammifères il y a une augmentation très claire avec l'âge des dommages oxydatifs à l'ADN, surtout une augmentation des délétions au niveau de l'ADN mitochondrial (ADNmt) (Finch, C.E. et Roth, G.S. 1999). L'étendue de ces dommages est de cent fois supérieure sur l'ADNmt que sur l'ADN génomique, surtout dans les neurones des noyaux gris de la base riches en dopamine, ce qui est en accord avec la théorie voulant que le métabolisme de la dopamine produit des radicaux libres via la production de peroxyde par la MAO (Finch, C.E. et Roth, G.S. 1999). Par contre, on retrouve remarquablement peu de délétion de l'ADNmt dans la rétine où la production de radicaux libres est très élevée (Soong, N.W. *et al.* 1996).

Il semble logique de penser que la peroxydation des lipides induite par l'âge pourrait avoir une grande influence sur la composition membranaire et sur sa fonction. Ceci pourrait lier l'hypothèse des radicaux libres avec la prochaine

hypothèse, celle d'une atteinte membranaire.

1.3.2.2 L'hypothèse d'une atteinte membranaire

La base de cette hypothèse vient des changements observés dans la composition de la membrane en fonction de l'âge et qui pourraient influencer les mécanismes de transduction des signaux. Dans le cerveau vieillissant, on observe une baisse du métabolisme des phospholipides accompagnée d'une baisse de l'incorporation des acides gras aux phospholipides et de leur degré d'insaturation (Bazan, N.G. 1989; Gaiti, A. 1989).

L'acide arachidonique et l'acide docosahexanoïque, les deux principaux phospholipides insaturés que l'on retrouve dans les tissus nerveux, sont des cibles de choix pour la peroxydation. Leur quantité diminue dans le cerveau vieillissant, laissant présager un lien entre ces deux phénomènes (Gaiti, A. 1989; Suzuki, H. *et al.* 1989). Ces changements pourraient être à l'origine d'une baisse de la fluidité membranaire (Choi, J.H. et Yu, B.P. 1995; Zs-Nagy, I. 1994), qui engendre une déficience des mécanismes de traduction des signaux (Battaini, F. *et al.* 1995; Zs-Nagy, I. 1994) et pourrait être à l'origine d'une modification de la fonction des différents récepteurs (Friedman, E. et Wang, H.Y. 1989).

1.3.2.3 L'hypothèse de l'oxyde nitrique (NO)

L'oxyde nitrique (NO) est un gaz diffusible capable de franchir les membranes cellulaires et qui est produit *in vivo* par une famille d'enzymes nommée oxyde nitrique synthétases (NOS). On retrouve des isoformes dans les cellules

endothéliales (eNOS) ainsi que dans les neurones (nNOS) qui sont constitutives et activées par la calmoduline en réponse à une augmentation du calcium intracellulaire (Hecker, M. *et al.* 1994). La forme inductible (iNOS) se retrouvant dans la microglie ne devient active que lors d'une réponse immunitaire et n'est pas activée par la calmoduline comme les formes constitutives (Murphy, S. *et al.* 1993). Tous les isoformes de NOS produisent le NO en transformant de l'arginine en citrulline (McCann, S.M. *et al.* 1998).

À des concentrations physiologiques le NO joue un rôle dans la régulation du flux sanguin cérébral, dans l'oscillation des neurones et dans la plasticité des synapses (Szabó, C. 1996). Une altération de la production de NO, comme on en retrouve lors du vieillissement, peut conduire à des changements neurodégénératifs (McCann, S.M. 1997; Peinado, M.A. 1998). Le NO est également en mesure de réagir avec le O_2^\bullet et former ainsi du $ONOO^\bullet$, qui est fortement neurotoxique (Huie, R.E. et Padmaja, S. 1993). Ceci pourrait contribuer aux dommages induits par les radicaux libres et contribuer au stress oxydatif grandissant avec l'âge.

1.3.2.4 Modifications du système glutamatergique

Il est reconnu que les fonctions cognitives s'étiolent avec l'avancement en âge et que ces déficits sont très variables d'un individu à l'autre. On croit que ces déficits pourraient provenir de modifications de la potentialisation à long terme (LTP), le principal mécanisme impliqué dans les processus neuronaux conduisant à l'apprentissage et la mémoire au niveau de l'hippocampe (Lynch, M.A. 1998).

Il est généralement admis que l'induction de la LTP vient de l'ouverture des

canaux NMDA et de l'entrée de calcium en découlant. Cette ouverture ne peut se faire que suite à l'activation des récepteurs AMPA environnants qui dépolarise la membrane et aide à lever le blocage voltage-dépendant exercé par le magnésium dans le canal ionique des récepteurs NMDA (Bliss, T.V. et Collingridge, G.L. 1993). Le reste de la mécanique permettant d'augmenter l'efficacité synaptique à long terme est encore le sujet de vifs débats (Lynch, M.A. 1998) mais a eu l'effet d'attirer l'attention sur les effets de l'âge sur le système de neurotransmission glutamatergique.

Les données sur la libération du Glu chez les animaux âgés normaux sont quelque peu confuses. En effet, avec l'âge on peut distinguer soit une hausse (Freeman, G.B. et Gibson, G.E. 1987) ou une absence de changement (Cobo, M. *et al.* 1992; Dawson, R.J. *et al.* 1989; Martinez, M. *et al.* 1995; McGahon, B. et Lynch, M.A. 1996; Palmer, A.M. *et al.* 1994; Wallace, D.R. et Dawson, R.J. 1992) de la libération basale du Glu. De la même manière, on peut distinguer soit une baisse (Aprikyan, G.V. et Gekchyan, K.G. 1988; Mullany, P. *et al.* 1996), une hausse (Freeman, G.B. et Gibson, G.E. 1987) ou une absence de changement (Dawson, R.J. *et al.* 1989; Martinez, M. *et al.* 1995; McGahon, B. et Lynch, M.A. 1996; Wallace, D.R. et Dawson, R.J. 1992) de la libération de Glu provoquée par le potassium (K^+) avec l'âge.

Les niveaux tissulaires d'acides aminés restent relativement stables avec l'avancement en âge, sauf pour une légère augmentation de la Gln (Banay-Schwartz, M. *et al.* 1989; Kirzinger, S.S. et Fonda, M.L. 1978; Kornhuber, M.E. *et al.* 1993; Strolin-Benedetti, M. *et al.* 1990). On observe aussi une augmentation de l'activité de la GS, tant dans le cerveau entier qu'au niveau de l'hypothalamus, du striatum, du cervelet et du tronc cérébral (Cao-Danh, H. *et al.* 1985). Par contre une baisse de l'activité de la GS dans des extraits de

cerveau entier de rats a également été décrite avec l'âge (Rajeswari, T.S. et Radha, E. 1984). De plus, il semble que les concentrations d'ammoniaque (Kirzinger, S.S. et Fonda, M.L. 1978; Rajeswari, T.S. et Radha, E. 1984) et d' α -cétoglutarate (Rajeswari, T.S. et Radha, E. 1984) cérébrales augmentent avec l'âge.

Beaucoup de travaux ont été réalisés sur les effets de l'âge en ce qui concerne les récepteurs du système glutamatergique mais les changements rapportés sont variables selon les équipes et sont probablement le résultat des différentes techniques utilisées et des différentes régions cérébrales étudiées. Ainsi, certains ont démontré qu'il existe avec l'âge soit une baisse significative de la densité des récepteurs NMDA (Fiore, L. et Rampello, L. 1989; Magnusson, K.R. et Cotman, C.W. 1993a; Magnusson, K.R. et Cotman, C.W. 1993b; Peterson, C. et Cotman, C.W. 1989; Tamaru, M. *et al.* 1991) ou une absence de changement (Araki, T. *et al.* 1997a; Araki, T. *et al.* 1997b; Araki, T. *et al.* 1997c; Mitchell, J.J. et Anderson, K.J. 1998; Miyoshi, R. *et al.* 1990; Miyoshi, R. *et al.* 1991; Nicolle, M.M. *et al.* 1996; Shimada, A. *et al.* 1997; Wardas, J. *et al.* 1997) dans de nombreuses régions cérébrales. Des études électrophysiologiques ont par contre décrit une absence de modification de la réponse des récepteurs NMDA à la glycine et au magnésium (Jasek, M.C. et Griffith, W.H. 1998), ainsi qu'une absence de changement des potentiels post-synaptiques excitateurs initiés par le NMDA (Billard, J.M. *et al.* 1997) ou le Glu (Jouveneau, A. *et al.* 1997) lors du vieillissement.

Certains chercheurs expliquent ces modifications observées sur les récepteurs NMDA en fonction de l'âge par une modification de la composition des différentes sous-unités les constituants (Araki, T. *et al.* 1997a; Billard, J.M. *et al.* 1997; Magnusson, K.R. 2000; Mitchell, J.J. et Anderson, K.J. 1998; Miyoshi, R.

et al. 1990). En effet, sur les récepteurs NMDA les sites de modulation sensibles à la glycine (Figure 1.5) sont diminués en fonction de l'âge (Araki, T. *et al.* 1997a; Kito, S. *et al.* 1990; Miyoshi, R. *et al.* 1990) mais pas dans la même proportion que les sites liant le Glu ou le MK801 qui se retrouvent sur d'autres sous-unités ou à l'intérieur du canal, respectivement. Tout dernièrement, une étude d'hybridation *in situ* a montré que l'expression des différentes sous-unités des récepteurs NMDA est modifiée avec l'âge en fonction de la région cérébrale observée (Magnusson, K.R. 2000). Des données récentes d'électrophysiologie (patch clamp) ont également suggéré une telle modification de la composition des récepteurs NMDA avec l'âge (Kuehl Kovarik, M.C. *et al.* 2000) .

En ce qui concerne les récepteurs métabotropiques pour le Glu, les données sont moins abondantes étant donné qu'il est relativement difficile d'en faire l'étude avec les moyens classiques d'autoradiographie et de liaison *in vitro*. On discerne une baisse du rythme métabolique (turnover) des phosphoinositols liés à la stimulation des récepteurs métabotropiques (Figure 1.5) avec l'âge qui n'est pas liée à une baisse d'expression de ces récepteurs ou de leurs protéines G, mais plutôt à une réduction de l'expression de la PI-PLC (Nicolle, M.M. *et al.* 1999). On a également constaté que le nombre de récepteurs pour l'IP₃ (Martini, A. *et al.* 1994) et leur efficacité à mobiliser le Ca²⁺ intracellulaire (Burnett, D.M. *et al.* 1990) sont diminués. Toutefois, une étude électrophysiologique a démontré que l'âge n'a pas d'influence sur l'effet produit par le t-ACPD, un ligand spécifique des récepteurs métabotropiques, sur le potentiel post-synaptique excitateur du Glu ou le potentiel post-synaptique inhibiteur du GABA (Jouveneau, A. *et al.* 1997).

En ce qui concerne les sites de capture du Glu de nombreux changements ont

encore une fois été décrits. On observe chez le rat une réduction de la capture du Glu au niveau des tranches corticales (Matsumoto, H. *et al.* 1982), des mitochondries (Vitorica, J. *et al.* 1985) ou des synaptosomes (Najlerahim, A. *et al.* 1990; Price, M.T. *et al.* 1981; Vatassery, G.T. *et al.* 1998; Wheeler, D.D. et Ondo, J.G. 1986) induite par l'âge. Ces changements ont été confirmés par une baisse des sites de liaison pour le ^3H -D-aspartate dépendants du sodium, un ligand spécifique des sites de capture du Glu, en fonction de l'âge (Araki, T. *et al.* 1997c). Une étude de microdialyse *in vivo* a également montré que le Glu extracellulaire est plus élevé chez les rats âgés et que sa concentration extracellulaire augmenté beaucoup plus chez ceux-ci lorsqu'on perfuse avec un inhibiteur de la capture du Glu (Massieu, L. et Tapia, R. 1997).

Ces changements, induits par le vieillissement normal sur les diverses composantes du système de neurotransmission glutamatergique, pourraient être impliqués dans la plus grande vulnérabilité du cerveau âgé aux effets d'une APC.

1.4 BUT DE L'ÉTUDE PROPOSÉE

Afin d'élucider les mécanismes responsables de la plus grande prévalence de l'EPS observée chez les patients plus âgés suite à un TIPS, nous avons étudié les effets d'une APC chez de jeunes rats adultes (3 mois) et âgés (24 mois). Nous avons choisi le rat porteur d'une APC comme modèle animal pour sa similarité avec l'atteinte humaine et sa reproductibilité.

Dans le but de vérifier l'hypothèse selon laquelle il y aurait une plus grande vulnérabilité des animaux âgés aux effets délétères de l'APC, nous nous sommes concentrés sur les mécanismes décrits dans la littérature et qui

semblent être à l'œuvre dans ce modèle animal jeune : 1) une hausse marquée de l'ammoniaque plasmatique, 2) l'apparition d'une astrocytose Alzheimer de type II, 3) l'émergence de modifications de l'activité ambulatoire et des rythmes nyctéméraux, 4) une altération du métabolisme énergétique cérébral tel que mesuré par le transport du ^{14}C -2-désoxyglucose, 5) une augmentation marquée des récepteurs aux benzodiazépines de type périphérique, 6) des variations des niveaux cérébraux de Gln et de Glu et finalement 7) des modifications de certains éléments du système de neurotransmission glutamatergique (transporteurs du Glu et récepteurs membranaires).

L'effet de l'âge *per se* et l'effet de l'âge combiné avec celui de l'APC ont été évalués pour tous ces paramètres, afin de distinguer les mécanismes propres au vieillissement de ceux reliés à l'APC.

1.5 MÉTHODOLOGIE UTILISÉE

1.5.1 Anastomose porto-cave (APC)

L'APC chez le rat a été retenu comme modèle animal d'EH pour sa relative simplicité, sa similarité avec l'atteinte humaine et sa reproductibilité. Le choix du rat comme modèle s'est aussi imposé pour des considérations d'espace, de coût et de disponibilité des animaux très âgés. L'injection de traceurs radioactifs très coûteux est également moins onéreuse chez un petit animal.

Les rats Sprague-Dawley, la race la plus commune de rats de laboratoire, ont une espérance de vie de 36 à 40 mois, tout au plus. À 24 mois, ces animaux sont très vieux sans toutefois être considérés comme étant sénescents et

devraient représenter un bon modèle du groupe d'âge de 70 à 80 ans chez l'humain. Nous avons décidé d'utiliser des rats de 24 mois car il existe une abondante littérature sur ce groupe d'âge et qu'ils sont les plus disponibles sur le marché.

Deux groupes de rats Sprague-Dawley de 2 et 24 mois d'âge chacun, ont été anesthésiés par inhalation avec de l'halothane. Une APC termino-latérale a été réalisée sous un microscope à dissection selon la technique de Lee et Fisher (1961). Brièvement, la veine porte a été nettoyée du péritoine l'entourant, puis clampée et ligaturée avant d'être coupée entre la pince et la ligature. La veine cave, une fois nettoyé du péritoine, fut alors partiellement clampée et une portion elliptique d'une dimension d'une fois et demie le diamètre de la veine porte, fut retiré de la partie clampée (Figure 1.6). Des points d'ancrages ont été réalisés à l'aide de soie 7.0 entre les extrémités de la veine porte et de la veine cave. La suture de l'anastomose proprement dite fut réalisée en commençant par la partie inférieure des deux veines et complétée par la partie supérieure, en formant de 4 à 5 points dans chaque cas (Figure 1.6). Une légère modification a été apportée dans le cas des animaux de 24 mois, car leurs vaisseaux étant plus gros, quelques points supplémentaires ont été nécessaires.

Deux autres groupes ayant le même âge et ayant subi le même stress opératoire sans l'anastomose ont servi de groupe contrôle (fausse opération ou sham). Comme pour les animaux anastomosés, ils ont été anesthésiés et ont subi une laparotomie suivie du nettoyage du péritoine et du clamage des deux vaisseaux pour une période identique aux rats ayant subi une APC.

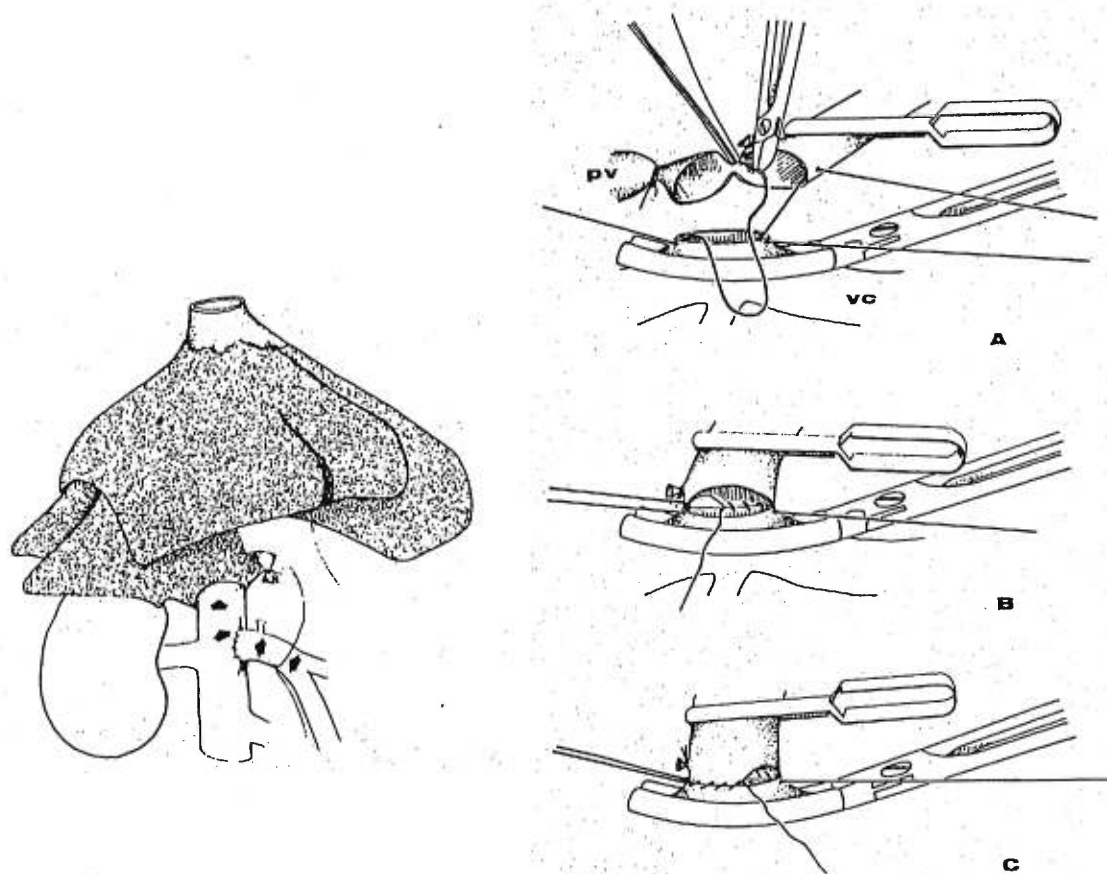


Figure 1.6 Détails de la procédure chirurgicale permettant la construction de l'anastomose porto-cave chez le rat. (tiré de: Castaing, D., Houssin, D. et Bismuth, H. (1980) Hepatic and portal surgery in the rat, Masson, Paris, pp67-78)

Le temps de clampage dans tous les cas n'a pas dépassé 15 min afin de ne pas entraver le flux sanguin intestinal trop longtemps et provoquer des saignements ou des complications postopératoires. La mortalité postopératoire combinée avec la mortalité lors de l'intervention n'a jamais excédé 2%. Comme les animaux étaient à jeun depuis au moins 12h et qu'ils n'ont pas tendance à manger tout de suite après l'opération, une solution de glucose 5% dans de la saline à 37°C a été introduite dans la cavité abdominale.

Le suivi postopératoire a été effectué de manière quotidienne la première semaine puis à tous les 2 ou 3 jours subséquent. Celui-ci comprenait une pesée ainsi que la vérification de l'état général de l'animal et de ses plaies.

Après le sacrifice, l'ouverture et le fonctionnement de l'anastomose a été vérifié par l'injection rétrograde de saline par la veine cave et le passage vers la veine porte a été confirmé.

1.5.2 Mesure des périodes d'activité ambulatoire spontanées

On se doit de souligner que la simple observation des rats ayant une APC ne permet pas de les distinguer des rats contrôles. De manière similaire, les rats ayant une APC depuis 3 semaines n'ont pas un comportement différent de leurs contrôles lorsqu'on les place dans un labyrinthe (Martin, J.R. *et al.*1980).

Nous avons choisi de mesurer l'activité ambulatoire spontanée comme indice de l'état neurologique des rats. L'avantage de cette approche vient du fait qu'elle est non invasive, qu'elle peut être répétée autant de fois que

nécessaire et surtout qu'elle est un reflet assez fidèle de certains symptômes observés chez l'humain. De plus, les rats ne sont manipulés qu'une seule fois avant la mesure d'activité et il n'y a aucune interférence humaine pour une période d'au moins 6h avant le début des mesures, évitant ainsi les biais liés au stress.

Les rats ont été placés séparément dans des cages translucides dans une pièce isolée et calme avec un cycle de 12h de lumière et 12h d'obscurité. Le temps que chaque rat passait soit au repos ou en mouvement, a été mesuré grâce à un système de faisceaux infrarouges informatisé. Les rats ont été laissés seuls au moins 6 h avant que les mesures ne débutent automatiquement à 18h00. Les données ont été enregistrées pendant 36h consécutives à 72h, 1 semaine et 3 semaines après l'opération. Le simple bris d'un faisceau infrarouge, même s'il est répétitif, n'a pas été considéré comme une activité ambulatoire car il correspond souvent à des mouvements de toilettage ou de balancement des animaux. Nous n'avons considéré que les mouvements impliquant le bris de plusieurs faisceaux et avons fait la somme cumulative de ces activités pour une période de 12h à la fois. Cette dernière mesure a été définie comme étant la période d'activité ambulatoire spontanée pour chacun des rats.

Afin de réduire la variabilité au minimum et d'éviter que des bruits sporadiques n'affectent qu'un seul groupe, nous avons pris soins d'effectuer en même temps les mesures d'activité ambulatoire sur un représentant de chaque groupe dans 4 cages différentes.

1.5.3 Mesure de l'utilisation locale du glucose cérébral

L'utilisation locale du glucose cérébral (ULGC) a été mesurée grâce à la méthode décrite par Sokoloff (1977). Nous avons retenu cette méthode par ce qu'elle utilise le traceur ^{14}C -désoxyglucose qui, à la différence du glucose, ne peut être métabolisé en CO_2 évitant ainsi la perte de traceur par la respiration et surtout permettant des délais expérimentaux plus longs. En fait, le ^{14}C -désoxyglucose est transporté dans la cellule de la même manière que le glucose et ce transport est directement proportionnel à l'utilisation du glucose par la cellule. Cette technique a l'avantage d'être très bien caractérisée, d'autant plus qu'elle est déjà utilisée avec succès chez l'humain dans les études utilisant le PET avec le traceur ^{18}F -désoxyglucose.

Le fait que l'exposition au traceur soit plus longue permet d'atteindre un certain équilibre et minimise ainsi les variations provenant de facteurs comme la rapidité de l'injection du traceur, le flux sanguin cérébral ou la concentration plasmatique de glucose (Sokoloff, L *et al.* 1977). Par contre, on doit assumer que les valeurs des constantes utilisées pour le calcul de l'ULGC, qui ont été déterminées chez des rats normaux, ne sont pas affectées par les changements induit par l'APC.

Le jour de l'expérience, les rats ont été anesthésiés par inhalation avec de l'halothane et deux cathéters (PE-50) d'un volume de 75 μl chacun ont été insérés dans l'aorte abdominale et la veine cave. Afin d'empêcher l'animal de bouger et d'arracher les cathéters, un plâtre a été apposé sur l'abdomen inférieur et la région pelvienne en prenant soin de ne pas restreindre les mouvements respiratoires de la cage thoracique. Les animaux ont récupéré de l'intervention pendant au moins 4 heures dans une pièce calme et isolée.

Un bolus de 25 $\mu\text{Ci/Kg}$ de $[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{-2-désoxyglucose}$ a été injecté via le cathéter veineux suivi immédiatement par 500 μl de saline (> 6 fois le volume mort du cathéter). Quinze échantillons de sang artériel (65 μl chacun) ont été prélevés dans des capillaires de verre héparinés à 0, 15, 30 et 45 sec, 1, 2, 3, 5, 7.5, 10, 15, 25, 35 et 45 min après l'injection. Le cathéter a été vidangé entre chaque prélèvement en injectant de la saline héparinée (5 U/ml) grâce à un sac de soluté sous pression. Des échantillons de sang ont également été prélevés aux temps 0, 20 et 44 min pour effectuer des analyses de pH, d'hématocrite, d'hémoglobine et de pression partielle d' O_2 et de CO_2 . Tous les échantillons ont été maintenus sur glace et centrifugés à la fin de l'expérience. Afin de déterminer le pic et la courbe de clairance du traceur, la radioactivité des échantillons de plasma (20 μl) a été mesurée par scintillation dans un compteur bêta (Beckman). La concentration de glucose plasmatique des échantillons (10 μl) a été mesurée avec la méthode de la glucose oxydase (Schmidt, F.H. 1961). La pression artérielle était constamment mesurée (sauf durant l'échantillonnage) à partir du cathéter artériel.

45 min après l'injection du traceur, les rats ont été décapités et des échantillons de sang furent prélevés pour déterminer les niveaux d'ammoniaque plasmatiques à l'aide d'une technique utilisant de la résine échangeuse de cations (Forman, D.T. 1964). Les cerveaux ont été rapidement prélevés et congelés dans de l'isopentane à -40°C , puis tranchés en sections de 20 μm , montées par décongélation sur des lames gélatinées et séchées rapidement sur une plaque chauffante à 55°C pour éviter tout mouvement du traceur dans les tranches. Les coupes de cerveaux ont été exposées à un film autoradiographique pendant 4 semaines avec des standards de $[^{14}\text{C}]\text{-méthylméthacrylate}$ (Amersham). La densité optique du film correspondant à différentes régions cérébrales a été mesurée à l'aide d'un

système d'imagerie équipé avec le logiciel MCID. L'ULGC fut calculée à partir de l'équation et des constantes de flux pour les matières grise et blanche publiée par Sokoloff (1977) pour des rats normaux.

1.5.4 Histologie

Immédiatement après le sacrifice un hémisphère complet a été immergé dans une solution de formaline pendant 24h. Des sections de 20 μm ont été ensuite réalisées puis colorées avec du crésyl violet (Nissl). Les comptes astrocytaires et le décompte des astrocytes Alzheimer de type II a été réalisé à 500X à l'aide d'une grille oculaire de 0.025mm². Le dénombrement a été effectué dans 3 sections différentes d'un même animal dans lesquelles 5 champs de 0.025mm² ont été choisis au hasard. La même procédure a été répétée une seconde fois et la moyenne des comptes astrocytaires et des astrocytes Alzheimer de type II par champs de 0.025mm² a été calculée pour chaque animal. Toutes les mesures ont été effectuées par une personne ne connaissant pas les groupes observés, afin d'éliminer les biais et l'interprétation erronée.

Les astrocytes Alzheimer de type II ont été définis selon des critères classiques, soit: un gros noyau avec une chromatine en marge lui donnant un aspect aqueux lorsqu'on bouge la vis micrométrique (Norenberg, M.D. 1977).

1.5.5 Autoradiographie quantitative des récepteurs aux benzodiazépines de type périphérique (RBTP)

Nous avons choisi d'étudier ce type de récepteur principalement par ce qu'il est fortement augmenté dans le cerveau des rats ayant subi une APC (Desjardins, P. *et al.* 1997; Desjardins, P. *et al.* 1999; Giguère, J.F. *et al.* 1992; Leong, D.K. *et al.* 1994; Rao, V.L. *et al.* 1994) ainsi que dans le cerveau de patients décédés des suites d'une EH (Lavoie, J. *et al.* 1990). Comme pour les changements comportementaux, cette augmentation des RBTP apparaît très tôt (24 à 48h) après la construction d'une APC et subsiste plusieurs semaines (Leong, D *et al.* 1994).

Ce type de récepteur semble être modulé à la hausse par l'hyperammoniémie chronique, comme celle observée chez des animaux ayant une déficience congénitale d'une enzyme du cycle de l'urée (Rao, V.L. *et al.* 1993). Étant donné que nous voulions évaluer le rôle de l'ammoniaque dans l'apparente vulnérabilité des patients plus âgés, nous avons jugé bon de mesurer un récepteur qui répond rapidement et de manière soutenue à l'augmentation plasmatique d'ammoniaque.

Quatre nouveaux groupes, identiques aux groupes utilisés pour la mesure de l'ULGC, ont été utilisés pour les études autoradiographiques. La radioactivité présente dans le cerveau des rats injectés avec du ^{14}C -désoxyglucose aurait masqué complètement le signal du ^3H -PK11195. Ces animaux n'ont donc pas subi de cathétérisation, de confinement ou d'anesthésie avant leur sacrifice.

Les tranches ont été incubées 1h dans du tampon Tris-HCl 170 mM (pH 7.4) contenant 1 nM ^3H -PK11195 (activité spécifique de 85.0 Ci/mmol, New England Nuclear). Afin de déterminer la liaison non spécifique, des sections

adjacentes ont été incubées dans le même tampon auquel 1 μ M de PK11195 non marqué a été ajouté (Research Biochemical Inc.). Cette incubation dans un tampon ayant un excès de ligand non marqué a pour effet de masquer tous les sites de liaison spécifiques, la radioactivité restante étant considérée comme étant le signal non spécifique. L'incubation fut terminée par l'immersion des tranches dans un bain de tampon Tris-HCl 170 mM à 4°C trois fois consécutives. Les tranches ont été ensuite plongées quelques secondes dans de l'eau distillée froide et séchées rapidement sous un courant d'air. Les sections séchées ont été ensuite mises en contact avec un film autoradiographique durant 3 semaines à 4°C.

Les régions d'intérêt ont été identifiées à l'aide de sections adjacentes colorées avec du crésyl violet ainsi qu'à l'aide d'un atlas des régions cérébrales du rat (Paxinos, G. et Watson, C. 1982). La densité optique du film correspondant à ces régions d'intérêt a été ensuite mesurée à l'aide d'un système d'analyse d'image et convertie en fmol/mg de tissu cérébral.

1.5.6 Western Blot

Pour tous les Westerns, un échantillon de tissu cortical fut homogénéisé dans un tampon RIPA (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 0.5% sodium désoxycholate), et un cocktail d'inhibiteurs de protéases composé de 1 mM EDTA, 0.1 μ M pepstatine A, 1 μ g/ml leupeptine, 1 μ g/ml aprotinine et 100 μ g/ml phénylméthyl-sulfonyl-fluor. Après une centrifugation à 12,000 g pendant 15 min., 50 μ g de protéines du culot ont été bouillis pendant 5 min. dans du tampon de chargement (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10 % glycérol, 2% SDS, 0.1 M dithiothreitol, 0.1% bleu de

bromophénol). Une électrophorèse fut pratiquée sur un gel dénaturant de polyacrylamide (SDS-PAGE) de 8% en même temps que des marqueurs de poids moléculaire. Un transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose a ensuite été réalisé toute la nuit. Les membranes ont ensuite été incubées dans une solution (TBST) saline tamponnée par du Tris-HCl 50 mM contenant 5% (p/v) de lait écrémé en poudre et 0.1% de Tween 20 pendant 2h à température de la pièce.

Dans le cas du GFAP, les membranes ont alors été incubées avec 0.05 µg/ml d'anticorps anti-GFAP de souris dans du TBST avec 5% (p/v) de lait écrémé en poudre, pendant 1h à température de la pièce. Suite à un rinçage avec du TBST les membranes ont été incubées avec un anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase du raifort dans le même tampon pendant 1h.

Dans le cas de la GS, les membranes ont été incubées avec 0.25 µg/ml d'anticorps anti-GS de souris dans du TBST avec 5% (p/v) de lait écrémé en poudre, pendant 1h à température de la pièce. Suite à un rinçage avec du TBST les membranes ont été incubées avec un anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase du raifort dans le même tampon pendant 1h.

Dans le cas du transporteur GLT1/EAAT2, les membranes ont été incubées avec 0.15 µg/ml d'anticorps anti-GLT1 de souris dans du TBST avec 5% (p/v) de lait écrémé en poudre, pendant 1h. Suite à un rinçage avec du TBST les membranes ont été incubées avec un anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase du raifort dans le même tampon pendant 1h.

Dans tous les cas les membranes ont été rincées à fond avec du TBST et exposées à un cocktail de chemoluminescence (ECL, Amersham) puis apposées sur un film autoradiographique. La densité optique relative (ROD)

des bandes immunoréactives a été mesurée à l'aide d'un système d'analyse d'image informatisé.

1.5.7 Autoradiographie quantitative des récepteurs glutamatergiques de type AMPA, NMDA et des sites de capture du glutamate

Dans le cas des récepteurs de type AMPA, les tranches ont été pré-incubées dans un tampon Tris-Acétate 50 mM (pH 7.2) pendant 30 min. à 4°C. Les tranches ont ensuite été incubées dans le tampon Tris-Acétate 50 mM (pH 7.2) contenant 50 nM de [³H]-AMPA (activité spécifique de 53.0 Ci/mmol, New England Nuclear) et 100 mM de thiocyanate de potassium (KSCN) pendant 10 min. à 4°C. La liaison non spécifique a été déterminée sur des sections adjacentes par l'ajout à ce tampon d'AMPA non marqué (100 µM). Les sections ont alors été rincées 4 fois avec le tampon Tris-Acetate 50 mM (pH 7.2) à 4°C, puis trempées brièvement dans de l'eau distillée froide.

Dans le cas des récepteurs de type NMDA, les tranches ont été pré-incubées dans un tampon Tris-Acétate 50 mM (pH 7.4) à 4°C pendant 30 min. Les tranches ont alors été incubées dans le tampon Tris-Acétate 50 mM (pH 7.2) contenant 5 nM de [³H]-MK801 (activité spécifique de 22.0 Ci/mmol, New England Nuclear) et 30 µM de Glu ainsi que 10 µM de glycine pendant 120 min. La liaison non spécifique a été déterminée sur des sections adjacentes par l'ajout à ce tampon de 5 µM MK-801 non marqué. Les sections ont alors été rincées une fois brièvement avec le tampon Tris-Acetate 50 mM (pH 7.2) à 4°C, puis laissées à tremper pendant 90 min dans ce

même tampon avant d'être brièvement plongées dans de l'eau distillée froide.

Dans le cas des sites de capture pour le Glu les tranches ont été pré-incubées dans un tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7.4) à température de la pièce pendant 10 min afin de retirer les acides aminés endogènes et les divers ions. Les tranches ont alors été incubées dans le tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7.4) contenant 100 nM D-[³H]-Aspartate (activité spécifique 10.9 Ci/mmol, New England Nuclear) et 300 mM de NaCl. La liaison non spécifique a été déterminée sur des sections adjacentes par l'ajout à ce tampon de 100 µM D,L-threo-β-hydroxyaspartate. Les sections ont alors été rincées 4 fois avec le tampon Tris-HCL 50 mM (pH 7.2) avant d'être brièvement plongés dans de l'eau distillée froide.

Après le rinçage, les sections ont été séchées rapidement sous un courant d'air. Les sections séchées ont alors été apposées sur un film d'autoradiographie avec des standards radioactifs pendant 3 à 4 semaines. avant le développement. Les régions d'intérêt ont été identifiées à l'aide de sections adjacentes colorées avec du crésyl violet ainsi qu'à l'aide d'un atlas des régions cérébrales du rat (Paxinos, G. et Watson, C. 1982). La densité optique du film correspondant à ces régions d'intérêt, a été ensuite mesurée à l'aide d'un système d'analyse d'image et convertie en fmol/mg de tissu cérébral.

1.5.8 Expression du gène GLT1/EAAT2

Suite à l'observation d'une augmentation de la liaison du ³H-D-aspartate ainsi que d'une hausse de la quantité de protéine GLT1/EAAT2 par Western chez les rats âgés ayant une APC, nous avons jugé nécessaire de vérifier s'il y avait

également une augmentation du niveau d'ARNm codant pour cette protéine. Dans ce but, nous avons effectué une amplification de l'ARNm codant pour le transporteur par la technique de la réaction en chaîne de la polymérase précédée d'une transcription reverse (RT-PCR). Pour ceci nous avons évidemment utilisé les mêmes échantillons de cortex dans lesquels nous avons noté l'augmentation de GLT1/EAAT2 et l'augmentation de liaison pour le $^3\text{H-D-aspartate}$. Étant donné la complexité et les coûts inhérents à ce dosage, seuls les groupes de rats âgés (APC et contrôles) ont été mesurés.

L'ARN total a été extrait avec le réactif TRI (MRC Inc.) selon le protocole du manufacturier. Toute contamination par de l'ADN a été éliminée par l'addition de 100 U de DNAase I par 50 μg d'ARN total à 37°C pendant 1h. L'ARN ainsi purifié a ensuite été extrait avec du phénol, précipité avec de l'éthanol et resuspendu dans de l'eau traitée avec du diéthylpyrocarbonate. Les échantillons d'ARNm ont été entreposés à -70°C jusqu'à leur utilisation.

L'étude de l'expression du transporteur GLT1/EAAT2 a été réalisée par la technique du RT-PCR. La β -actine a été utilisée comme contrôle interne afin d'évaluer les variations issues du chargement sur le gel. L'ARN total (1 μg) a été mélangé avec 10 mM de Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 0.01%(p/v) d'albumine sérique bovine, 100 μM dNTPs, des amorces à 1 μM chacun, de la AMV reverse transcriptase (80 U/ml), de la Taq DNA polymerase (20 U/ml) et 50 $\mu\text{Ci/ml}$ [α - ^{32}P]dCTP (3000 Ci/mM), pour un volume total de réaction de 50 μl . Initialement, cette solution a été chauffée à 50°C pendant 15 min puis suivie par un PCR à 95°C pendant 30 sec, 60°C pendant 1 min et 72°C pendant 1 min. Les conditions optimales d'amplification ont été déterminées suite à une étude cinétique afin de s'assurer que toute l'expérience a été réalisée dans la phase exponentielle de

la réaction d'amplification dans laquelle la quantité de produits de la réaction de PCR phase of amplification restent proportionnels à la quantité initiale d'ARNm. La β -Actine et le GLT-1/EAAT2 ont été amplifiés pendant 18 cycles et 19 cycles, respectivement. Après l'amplification, les échantillons ont subi une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide (8%), ont été séchés et ont été apposés sur un film d'autoradiographie à -70°C avec un écran d'intensification. Chacune des bandes a été excisée et la radiation de Cerenkov a été mesurée à l'aide d'un compteur- β . Les amorces d'oligonucléotides (Sheldon Biotechnology Center, McGill University) ont été construites à l'aide du logiciel PRIME (Genetic Computer Group, Wisconsin) sur la base des numéros d'accès de la banque GeneBank suivant: β -actine: V01217 (Nudel, U. *et al.* 1983) et GLT-1: X67857 (Storck, T. *et al.* 1992). Les séquences sens et anti-sens des amorces étaient: CATCCCCCAAAGTTCTAC et CCAAAGCCTTCATACATC (β -actine, 347bp); TACAGCCCTTTACGAAGCC et TGATAGACAATCCCAGCCC (GLT-1, 285bp). La spécificité des amorces d'oligonucléotides a été vérifiée à l'aide du logiciel BLASTN (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD).

1.5.9 Chromatographie liquide sous haute pression

Comme nous avons déjà observé des changements au niveau des sites de capture du Glu chez les animaux âgés ayant une APC, nous nous sommes demandé quels étaient les niveaux tissulaires des principaux acides aminés reliés au métabolisme de l'ammoniaque et à la neurotransmission. Nous avons choisi la chromatographie liquide sous haute pression par ce qu'elle est simple et qu'elle permet de mesurer presque tous les acides aminés en même temps dans un même échantillon. À la suite des autres études déjà

mentionnées, la quantité de cortex cérébral disponible est devenue de plus en plus réduite, il était impératif d'effectuer des mesures ne nécessitant pas beaucoup de tissus. À cet égard, la chromatographie liquide sous haute pression représente une solution quasi parfaite. Les échantillons provenant de minuscules morceaux de cortex pouvant être dilués, permettant ainsi des mesures en triplicata.

Les échantillons corticaux congelés ont été passés au sonicateur dans 400 μ l de tampon au phosphate de potassium (50 mM pH 7.4) comme il a déjà été décrit (Lavoie, J. *et al.* 1987). 10 μ l de cette solution fut conservée pour le dosage des protéines. Puis, 100 μ l d'acide perchlorique 50% (v/v) fut ajouté au restant de la solution, passée au vortex immédiatement et centrifugée à 28 000 g pendant 10 min. Ensuite, 1 ml de of cold diéthyléther (DEE) saturé d'eau a été ajouté au surnageant et passé au vortex. Une fois les deux phases séparées, le DEE surnageant a été jeté et cette étape de lavage a été répétée une seconde fois. La solution restante fut diluée 1/275 et 1 μ l de cette solution a été mélangée à 1 μ l de norvaline 0.3 mM, comme standard interne, puis la réaction avec le fluorochrome (OPA) a été initiée dans un volume total de 28 μ l. Exactement 60 sec plus tard, la réaction a été stoppée par l'ajout de 20 μ l de HCl (0.5 M). 20 μ l de cette solution a été injectée dans la colonne de chromatographie (C₁₈ Pecosphere, Perkin Elmer) exactement 2 min. après le début de la réaction avec l'OPA. L'aire sous la courbe des pics correspondants à chacun des acides aminés a été calculée à l'aide d'un intégrateur programmable (Perkin Elmer LC-100). Le chromatogramme fut réalisé grâce à un gradient linéaire entre du méthanol et un tampon de phosphate de sodium (50 mM, pH 5.25, avec du tétrahydrofurane (THF) 2%), comme décrit dans la littérature (Lavoie, J. *et al.* 1987). Ce gradient fait passer le méthanol de 25% jusqu'à 50% en 35 min.,

puis reste à 50% de méthanol pendant 20 min. La colonne de chromatographie fut alors rincée avec une solution de 25% méthanol/75% tampon pendant 5 min. puis rééquilibrée avec une solution de 25% méthanol/75% tampon pour 3 min. additionnelles avant d'être réutilisée. La concentration des acides aminés a été calculée à partir de l'aire sous la courbe de chacun des pics d'acides aminés à l'aide d'une courbe standard et du standard interne (norvaline).

CHAPITRE 2: RÉSULTATS

2.1 MODIFICATIONS COMPORTEMENTALES

Nous avons noté chez les rats ayant subi une APC, tant jeunes que vieux, les mêmes baisses d'activité spontanée nocturne (Figure 2.1) qui ont été amplement décrites chez ce modèle animal (Herz, R. *et al.* 1972; Therrien, G. *et al.* 1995; Zee, P.C. *et al.* 1991). Par contre, chez les animaux âgés ayant une APC, nous avons également observé une baisse significative de l'activité ambulatoire spontanée diurne, cette période correspondant à leur période normale de sommeil (Figure 2.1). Cette baisse d'activité ambulatoire spontanée diurne chez les vieux rats suite à l'APC s'installe en moins d'une semaine et persiste jusqu'à trois semaines après l'APC. De la même manière, la baisse d'activité ambulatoire nocturne observée tant chez les jeunes rats adultes que les vieux suite à l'APC, s'installe rapidement et se maintient jusqu'à trois semaines après la chirurgie. Il est probable que ceci représente une plus grande altération de leurs cycles d'éveil et de sommeil, elle-même le reflet d'une plus grande vulnérabilité de ces animaux âgés aux effets de l'APC.

Une réduction de la durée totale du sommeil a déjà été décrite chez ce modèle animal (Beaubernard, C. *et al.* 1980; Lantin, N. *et al.* 1979; Monmaur, P. *et al.* 1976) ainsi que chez l'humain (Córdoba, J. *et al.* 1998). Toutefois, aucune étude ne fait état d'un effet de l'âge sur les modifications des cycles d'éveil et de sommeil dans le contexte de l'EPS.

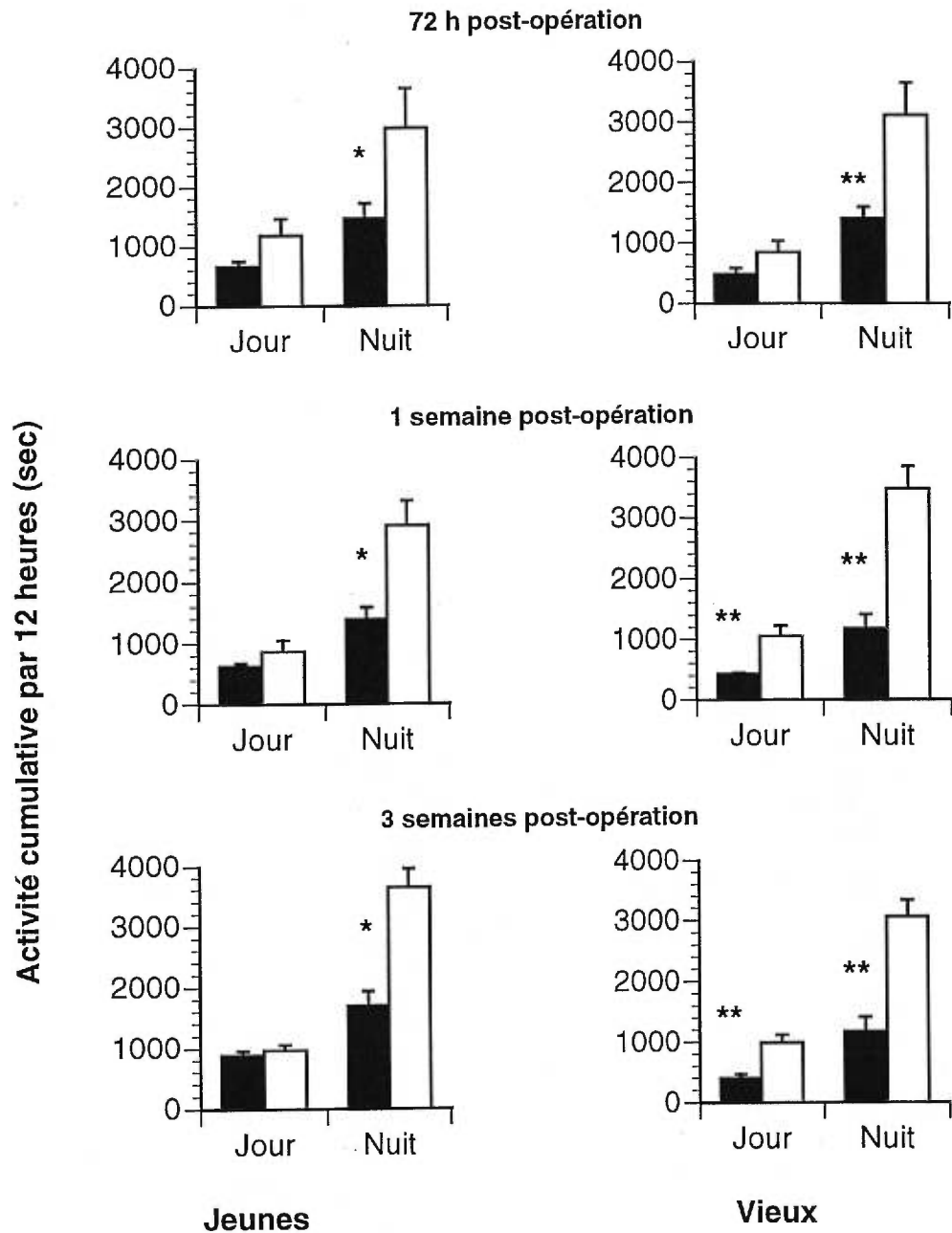


Figure 2.1 Période d'activité ambulatoire spontanée des rats contrôles (colonnes vides) et des rats avec une APC (colonnes pleines) jeunes (à gauche) et vieux (à droite). Les données 72 h, 1 semaine et 3 semaines après l'opération sont représentées en haut, au milieu et en bas, respectivement. Les valeurs sont exprimées en secondes de mouvements ambulatoires spontanés par tranche de 12 h, les barres d'erreurs correspondent à l'erreur type. Les valeurs significativement différentes du groupe ayant subi une fausse opération à l'intérieur d'un même groupe d'âge sont indiquées par * $p < 0.05$ et ** $p < 0.001$ par analyse de variance

Des études ont déjà démontré que chez les rats ayant une APC, il y a une réduction de l'activité ambulatoire et exploratrice concomitante avec l'apparition d'une astrocytose Alzheimer de type II (Mariani, P. *et al.* 1996; Ribeiro, J. *et al.* 1992). Il est intéressant de noter que chez nos rats ayant une APC, une astrocytose Alzheimer de type II ne survient que chez les animaux âgés et que dans ce même groupe on discerne une réduction de l'activité ambulatoire spontanée diurne.

2.2 Article 1

Portacaval Anastomosis Results in More Widespread Alterations of Cerebral Metabolism in Old Versus Young Adult Rats: Implications for Post-Shunt Encephalopathy

Metabolic Brain Disease Vol. 13, No. 1, 1998

Robert M. Audet¹ and Roger F. Butterworth^{1,2}

¹ Neuroscience Research Unit, CHUM pavillon Saint-Luc (University of Montreal), Montréal, Québec, Canada

² To whom correspondence should be addressed at Neuroscience Research Unit, CHUM pavillon Saint-Luc, 1058 St-Denis Street, Montréal, Québec H2X 3J4 Canada,

ABSTRACT

Treatment of portal hypertension by portal decompressive surgery or transjugular intrahepatic portosystemic stent shunt (TIPS) results in new or worsening episodes of portal-systemic encephalopathy, particularly in older patients. As part of a series of studies to elucidate the pathophysiologic mechanisms responsible for the age-related increased portal-systemic encephalopathy following shunt surgery, local cerebral glucose utilization, a measure of regional brain functional activity, was assessed using the ^{14}C -2-deoxyglucose autoradiographic technique in 2 month-old (young adult) and 24 month-old (old adult) rats following end-to-side portacaval anastomosis. Cerebral glucose utilization was decreased by 22% ($p < 0.05$) in frontal cortex of 2 month-old rats following portacaval anastomosis. More widespread alterations of glucose utilization, involving frontal and frontoparietal cortices, as well as thalamic structures were observed in the brains of 24 month-old rats following portacaval anastomosis despite blood ammonia concentrations of a comparable magnitude. Decreased cerebral glucose utilization in frontal and frontoparietal cortex of old adult rats following portacaval anastomosis probably results from decreased cerebral energy requirements as a consequence of neurotransmitter-related dysfunction. The greater susceptibility of aging brain to the deleterious effects of portacaval anastomosis is consistent with the higher incidence of encephalopathy in older cirrhotic patients following portacaval anastomosis or TIPS.

INTRODUCTION

Portal hypertension is a major cause of morbidity and mortality in cirrhotic patients (Gines *et al.*, 1987). Consequences of portal hypertension include ascites and esophageal varices which may result in life-threatening hemorrhage. Treatment of these conditions includes portal decompressive surgery either by creation of a portacaval shunt or, more recently, a transjugular intrahepatic portosystemic stent shunt (TIPS). Unfortunately, both procedures are complicated by the development of new (or worsening) episodes of hepatic encephalopathy in up to 40% of cases (Gines *et al.*, 1987; Mutchnick *et al.*, 1974; Rössle *et al.*, 1994; Sanyal *et al.*, 1994). Several predictive factors have been identified for the development of encephalopathy in patients with TIPS. These predictors include a prior history of encephalopathy, large diameter of the shunt and advanced age of the patient (Rössle *et al.*, 1994; Shiffman *et al.*, 1995; Somberg *et al.*, 1995). In a recent study, 15 out of 23 patients (40%) over the age of 60 years developed clinically significant encephalopathy following TIPS (Rössle *et al.*, 1994).

As part of a series of studies to elucidate the underlying mechanisms responsible for the increased incidence of encephalopathy following portal-systemic shunting in older individuals, end-to-side portacaval anastomoses were created in groups of 2 month-old (young adult) and 24 month-old (old adult) male rats. Evaluations were made of the effect of portacaval anastomosis (PCA) on local cerebral glucose utilization (LCGU), using ^{14}C -2-deoxyglucose autoradiography, an established method for the study of regional brain metabolism (Sokoloff *et al.*, 1977). Following PCA, old adult rats were found to manifest more widespread alterations in LCGU compared to their young adult counterparts.

MATERIALS and METHODS

Surgical techniques

Two groups of animals (n=5 each of 2 month-old and 24 month-old Sprague-Dawley rats) were anesthetized with halothane by inhalation, and an end-to-side portacaval anastomosis was performed according to the guidelines of Lee and Fisher (Lee and Fisher, 1961). Total surgery time was less than 15 min and overall mortality for shunted rats was <2%. Two additional groups of rats (n=5 each of 2 month-old and 24 month-old Sprague-Dawley rats, weight-matched with the above groups) were similarly anesthetized, a laparotomy was performed, and the inferior vena cava and portal vein were clamped for 15 min (sham-operated controls). All portacaval shunts were verified by retrograde injection of saline into the inferior vena cava at the time of killing and were found to be patent.

Determination of LCGU

LCGU was measured using the ^{14}C -deoxyglucose autoradiographic method of Sokoloff *et al.* (1977). Four weeks post-surgery, rats were anesthetized with halothane and two PE-50 catheters were inserted in the inferior vena cava and the dorsal aorta, as previously described (Sokoloff *et al.*, 1977).

A bolus injection of 25 $\mu\text{Ci}/\text{Kg}$ [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-2-deoxy-D-glucose was administered via the venous catheter and immediately flushed by 500 μl of saline. To determine the peak concentration and clearance curve of radioisotope, radioactivity was determined in samples of plasma. Arterial blood glucose concentrations were

measured by the glucose oxidase method (Schmidt, 1961).

Forty five minutes after injection of the radioisotope, rats were decapitated and neck blood was collected into heparinized tubes and centrifuged for ammonia determination using the cation exchange resin technique (Forman, 1964). Brains were removed and quickly frozen in isopentane at -40°C . Brains were sectioned using a cryostat in $20\ \mu\text{m}$ sections which were thaw-mounted on gelatin-coated glass cover slips and then dried on a hotplate at 55°C . The sections were exposed to autoradiographic film for two weeks together with calibrated [^{14}C]-methylmethacrylate standards. Optical densities were measured with an imaging system and LCGU was calculated using the operational equation, the lumped constant, and the rate constant for gray and white matter as previously described (Sokoloff *et al.*, 1977). Regions of interest were localized with the help of adjacent sections stained with cresyl violet (Nissl stain) in accordance with an established rat brain atlas (Paxinos and Watson, 1982).

Statistical analysis

For each brain region, LCGU was compared for the two variables (age and portacaval shunting) using a two way analysis of covariance (ANCOVAR) with the average LCGU for all regions sampled in each rat used as a covariable. For two by two intergroup comparisons a Fisher least significant difference (LSD) post hoc test was performed. A two way ANOVA was used for physiological parameters with the LSD post hoc test.

RESULTS

Physiological data for young (2 month old) and old (24 month old) adult rats following end-to-side portacaval anastomosis or sham operation are shown in Table 2.1.

Table 2.1. Physiological data of 2- and 24-month old rats four weeks after portacaval anastomosis or sham operation

Parameter	Young		Old	
	Sham	Shunt	Sham	Shunt
Body weight (g)	419± 23	295± 23*	711± 23††	533± 23*††
Liver weight (g)	14.6± 0.9	6.3± 0.9*	21.5± 0.9††	7.7± 0.9*
Arterial pressure (mmHg)	109± 3	91± 3*	122± 3††	96± 3*
Glucose (mg/dl)	208± 13	162± 13*†	124± 13††	122± 13
Ammonia (µg/dl)	147.0± 12.3	309.7± 32.4*	159.3± 18.4	334.1± 32.6*
PCO ₂ (mmHg)	39.0± 0.9	36.3± 0.9*	35.0± 0.9†	34.2± 0.9
PO ₂ (mmHg)	100.3± 4.7	120.6± 4.7*	90.7± 4.7	103.0± 4.7*††

Values are mean ± S.E. of duplicate determinations from 5 animals per treatment group. Significant differences between portacaval shunted (shunt) and sham-operated controls (sham) values within the same age group are indicated by * $p < 0.05$. Significant difference between young and old rats indicated by † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ by analysis of variance with post hoc LSD test.

Following portacaval anastomosis, both young and old rats lost a significant amount of body weight for up to 15 days post surgery. However, weight gain curves in portacaval-shunted rats 3 weeks post surgery were similar to those of

sham-operated controls. Significant liver atrophy, of an equivalent magnitude, was observed following portacaval anastomosis in both young and old rats. The portacaval shunting procedure had a statistically significant effect on mean arterial pressure and PO_2 in both young and old rats and a significant effect on PCO_2 in young animals. However, the changes were modest (<20%) and unlikely to be of major pathophysiological significance. Blood ammonia concentrations were increased by approximately 60% ($p < 0.05$) in both young and old rats following portacaval anastomosis, confirming previous findings in young adult animals (Girard *et al.*, 1993). Blood glucose concentrations were reduced by up to 20% ($p < 0.05$) in young adult rats following portacaval anastomosis but were unchanged in old animals. Similar findings of reduced blood glucose were previously reported following portacaval anastomosis in young adult rats (Cruz and Duffy, 1983). Changes of blood glucose of this magnitude do not affect the "lumped constant" required for the determination of LCGU (Sokoloff *et al.*, 1977).

LCGU

LCGU in brain regions from young and old adult rats 4 weeks following portacaval anastomosis or sham operation are shown in Table 2.2 and in Figure 2.2.

Table 2.2 Local cerebral glucose utilization (LCGU) following portacaval anastomosis in young versus old adult male rats

Brain region	Young		Old	
	Sham (n=5)	Shunt (n=5)	Sham (n=5)	Shunt (n=5)
Cerebral cortex				
Frontal	119.7± 5.3	96.7± 4.6*	121.9± 4.7	107.9± 4.7*
Anterior cingulate	121.9±11.1	114.0± 9.5	144.8± 9.9	140.1± 9.9
Fronto-parietal	132.9± 7.0	118.3± 6.0	139.1± 6.2	119.8± 6.2*
Posterior cingulate	137.3± 9.9	134.9± 8.5	139.9± 8.8	143.4± 8.8
Hippocampus				
CA1	85.2± 4.1	74.2± 3.5	91.2± 3.7	97.4± 3.7
CA2	92.5± 3.5	85.3± 3.0	88.8± 3.1	88.3± 3.1
CA3	88.1± 4.7	82.5± 4.0	92.8± 4.2	88.5± 4.2
Dentate gyrus	75.6± 3.4	74.8± 2.9	73.2± 3.0	74.6± 3.0
Thalamus	134.2± 4.1	137.3± 3.5	129.5± 3.6	141.0± 3.6*
Pons				
Pontine nuclei	78.4 ± 4.2	82.7± 3.6	69.8 ± 3.8	71.4± 3.8
Med. superior olive	146.4±14.0	161.9±10.0	105.3±10.5	109.0±10.5
Inferior olive	93.7± 9.1	105.6± 6.6	89.7± 6.9	90.7± 6.9
Midbrain Reticular formation				
Rostral	76.4± 4.4	80.6± 3.7	72.1± 3.9	79.5± 3.9
Caudal	62.1± 6.6	79.4± 5.7	70.0± 5.9	76.9 ± 5.9

Values are expressed as $\mu\text{mol}/100 \text{ g}/\text{min}$ and represent the mean \pm S.E. for each region of 5 rats per treatment group. Values significantly different from the corresponding sham-operated control values indicated by * $p < 0.05$ by Analysis of Covariance.

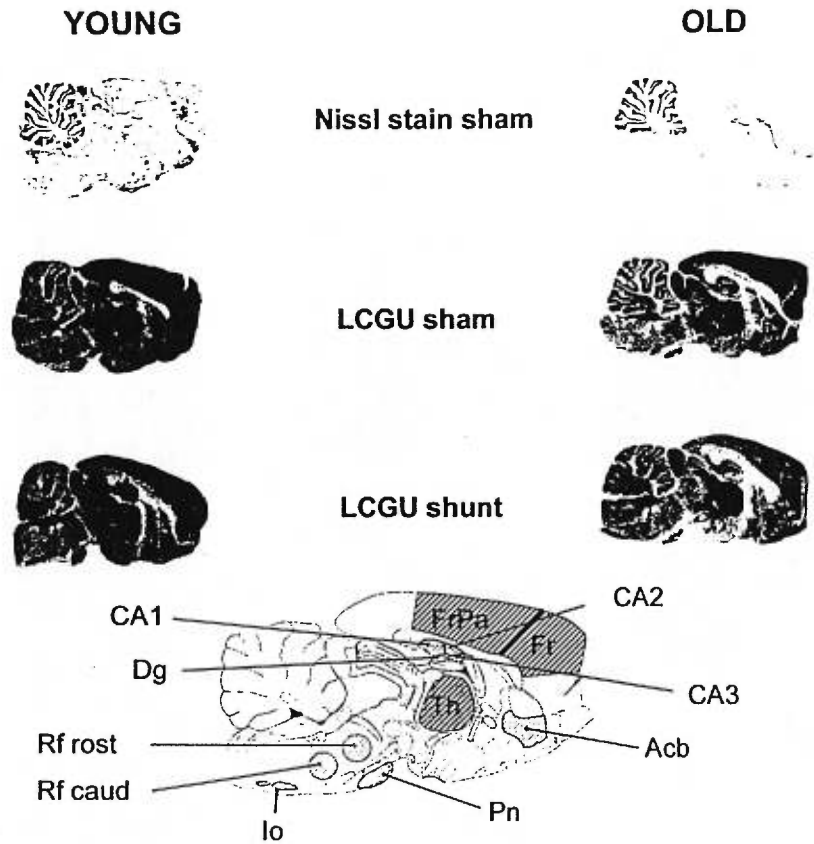


Figure 2.2 Representative ^{14}C -2-deoxyglucose autoradiograms and Nissl stain (sham) from mid-sagittal sections of brains of young and old adult rats following portacaval anastomosis or sham operation. Note more extensive decreases in glucose utilization throughout frontal and frontoparietal cortices and concomitant increase in thalamus of old adult animals following portacaval anastomosis. Fr=frontal cortex; FrPa=frontoparietal cortex; CA₁, CA₂ and CA₃ regions of hippocampus; Dg=dentate gyrus; Th=thalamus; Acb=accumbens; Rf rostr=reticular formation (rostral); Rf caud=reticular formation (caudal); Pn=pontine nuclei; Io=inferior olive.

PCA in both young and old rats resulted in decreased LCGU in most cerebral cortical and hippocampal structures. Decreases ranged from 1 to 22% and were statistically significant in frontal cortex of young adult rats and in both frontal ($p < 0.05$) and frontoparietal cortex ($p < 0.05$) of old adult animals following PCA (Figure 2.2, Table 2.2). In contrast to cerebral cortical and hippocampal structures, thalamic and pontine regions manifested increased LCGU following PCA. In the case of old rats following PCA, increased LCGU values in thalamus reached statistical significance ($p < 0.05$).

DISCUSSION

Results of the present study reveal that PCA results in more widespread alterations of LCGU in old compared to young rats. Whereas LCGU changes in young adult rats following PCA were confined to frontal cortex, such changes in old animals extended through frontal and frontoparietal cortex and thalamus. Data from the present study reveal a redistribution of metabolism from cortical and hippocampal regions to subcortical (thalamic) structures. Evidence for a similar redistribution of cerebral blood flow and metabolism has previously been reported in patients with liver disease and mild encephalopathy (Lockwood *et al.*, 1991b). Since LCGU is closely coupled to local functional activity in the brain, the more widespread alterations of LCGU in old versus young rats, in the present study, suggests more widespread derangements of cerebral function following PCA in these animals.

The more widespread changes in LCGU in old rats following portacaval anastomosis could result theoretically from the decreased blood glucose in these animals and consequently, alterations in the value of "the lumped

constant" used in the calculation of LCGU using the ^{14}C -2-deoxyglucose autoradiographic method (Sokoloff *et al.*, 1977). However, this is unlikely since (i) blood glucose concentrations in old adult rats following sham operation are reduced by a comparable magnitude to those of portacaval-shunted animals and (ii) previous studies using the ^{14}C -2-deoxyglucose technique revealed no changes in the value of the lumped constant in young adult rats up to 12 weeks following portacaval anastomosis despite a 40% decrease in blood glucose (Cruz and Diemel, 1994; Cruz and Duffy, 1983). Thus, the significant alterations of LCGU in frontal cortex, frontoparietal cortex and thalamus of old rats following portacaval anastomosis most likely reflect altered cerebral metabolism in these brain areas. Rats with portacaval shunts manifest a spectrum of neurological symptoms including altered circadian rhythms (Coy *et al.*, 1992), day-night activity patterns (Therrien *et al.*, 1995), reduced responsiveness to external stimuli (Cruz and Duffy, 1983) and abnormal reflexes (Giguère and Butterworth, 1984). Reductions of LCGU following PCA could be of pathophysiologic significance. The present finding of a 22% reduction in LCGU in frontal cortex of young adult rats following portacaval anastomosis is similar in magnitude to the 26% reduction in LCGU in cerebral cortex (Eklof *et al.*, 1974) and the 20% reduction of cerebral cortical metabolic rate for oxygen (CMRO_2) reported by others (Nieto *et al.*, 1980) in young adult rats following portacaval shunting. More generalized (20-30%) reductions in brain glucose utilization have also been reported following portacaval anastomosis using ^{14}C -glucose rather than ^{14}C -deoxyglucose (Mans *et al.*, 1983).

Whether the decrease in LCGU in frontal and frontoparietal cortices of old versus young adult rats following portacaval anastomosis is the consequence of ammonia toxicity is unclear. In favour of such a possibility, a previous study

described selective reductions of LCGU in cerebral cortex of rats exposed to ammonia (Lockwood *et al.*, 1982). However, blood ammonia concentrations, in the present study, were increased following portacaval anastomosis by a comparable magnitude in both young and old rats. Furthermore, in a previous study, no significant correlations were observed between LCGU changes and blood ammonia concentrations in rats up to 12 weeks following PCA (Cruz and Duffy, 1983). However, it has been demonstrated that aging *per se* results in increased brain ammonia concentrations (Kirzinger and Fonda, 1978). Additional increases of brain ammonia resulting from PCA in older animals therefore could result in potentially neurotoxic concentrations of ammonia which could, in turn, have adverse effects on neuronal excitability. Such effects include direct actions on excitatory (glutamatergic) neurotransmission (Fan *et al.*, 1990), effects on inhibitory neurotransmission via an action on chloride extrusion (Raabe, 1987) and, ultimately, by inhibition of α -ketoglutarate dehydrogenase (Lai and Cooper, 1986), a deleterious effect on cerebral energy metabolism. Studies of brain ammonia accumulation and metabolism following PCA in young versus old rats will be required in order to further address its possible role in the pathogenesis of these changes.

Recently we have demonstrated that PCA in the old rat leads to increased and more widespread expression of binding sites for the "peripheral-type" benzodiazepine receptor (PTBR) ligand ^3H -PK11195 (Audet and Butterworth, 1996). The PTBR is a receptor located on the mitochondrial membrane which has been implicated in oxidative metabolism and in neurosteroid synthesis in brain (Giesen-Crouse, 1993). Neurosteroids such as pregnenolone are potent agonists of the GABA-A receptor in brain and thus have the potential to increase neuroinhibition (Korneyev *et al.*, 1993). Hyperammonemia results in increased expression of PTBRs both in the presence (Giguère *et al.*, 1992) or

absence (Rao *et al.*, 1994) of liver disease as well as in cultured astrocytes exposed to ammonia (Itzhak and Norenberg, 1994). Increased neurosteroid synthesis in brain mediated by increased expression of PTBRs and the ensuing increase in GABA-mediated inhibition offers one plausible explanation for the reduced LCGU in frontal and frontoparietal cortex of rats following PCA observed in the present study.

Other mechanisms that could be invoked to explain the alterations of LCGU following PCA in old rats include modifications of inhibitory and excitatory neurotransmitter systems. Portacaval anastomosis in young adult rats results in significant alterations in cerebral cortical serotonin (Bergeron *et al.*, 1990) and dopamine (Bergeron *et al.*, 1995) synthesis and turnover, in glutamatergic synaptic dysregulation consisting of a loss of postsynaptic glutamate (NMDA) receptors (Peterson *et al.*, 1990), increased extracellular aspartate (Rao *et al.*, 1995) as well as modifications of opioid receptors (De Waele *et al.*, 1996). Modifications of these systems could result in an imbalance between, for example, excitatory and inhibitory inputs to cerebral cortex, resulting in increased cortical inhibition, in reduced energy requirements and consequently, diminished fuel (glucose) requirements and, hence, decreased LCGU. Further studies are required in order to establish if excitatory or inhibitory neurotransmitter changes are more pronounced or more widespread in the brains of old versus young animals following PCA.

Patients with chronic liver disease and mild PSE manifest significant decreases of LCGU as measured using Positron Emission Tomography (PET) and ^{18}F -fluorodeoxyglucose as ligand (Lockwood *et al.*, 1993). In these studies, reductions of LCGU were apparent in cerebral cortical areas including those centers that mediate attention, target analysis and response formulation

and it was suggested that such changes could explain the deficit in neuropsychologic test scores frequently observed in patients with chronic liver disease (Pomier Layrargues *et al.*, 1991; Tarter *et al.*, 1984). Furthermore, PET studies using $^{15}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ (Lockwood *et al.*, 1991a) as well as Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) (O'Carroll *et al.*, 1991) reveal significant reductions of cerebral blood flow (CBF) in cerebral cortex of patients with chronic liver disease. In the case of the SPECT studies, the degree of cognitive impairment was directly correlated with functional abnormalities in basal ganglia and limbic cortex (O'Carroll *et al.*, 1991). No studies, however, have assessed the effect of age on LCGU or CBF in patients with chronic liver disease. Age *per se* did not significantly affect LCGU in cerebral cortical or thalamic structures of sham-operated control rats in the present study. Similarly, other studies have demonstrated no significant reductions of LCGU in frontal cortex of rats up to 36 months of age (Smith *et al.*, 1980). Thus the findings, in the present study, of more widespread reductions in LCGU following portacaval anastomosis in old versus young adult rats are probably the consequence of the portacaval shunt procedure rather than of aging *per se*. Reductions of LCGU in frontal and frontoparietal cortices of old rats following portacaval anastomosis was accompanied by a small but significant rise in LCGU in thalamus. Interestingly, a similar increase of LCGU (Lockwood *et al.*, 1993) and CBF (Lockwood *et al.*, 1991a) were previously reported in thalamic structures of patients with chronic liver disease where it was suggested that this increase could represent a compensatory effect resulting from increased thalamic neuronal activity (Lockwood *et al.*, 1993). The thalamus plays a pivotal role in sensory and motor control, providing sensory inputs to cerebral cortex. Reductions in LCGU in cortex together with increases in thalamus suggests that PCA in the old rat may result in

modifications of thalamocortical function.

In summary, results of the present study reveal more widespread changes in cerebral glucose utilization following portacaval anastomosis in old adult versus young adult rats. These age-related changes following portacaval shunting were not the result of greater increases of blood ammonia concentrations in these animals. However, relatively greater increases of brain ammonia and the consequent deleterious effect on neuronal excitability and cerebral energy metabolism could be implicated. Diminished LCGU following PCA could also result from decreased brain energy requirements and increased inhibition as a consequence of neurotransmitter imbalance. These findings of greater susceptibility of cerebral function in the aging brain to the deleterious effects of PCA is consistent with the higher incidence of encephalopathy in older cirrhotic patients following PCA or TIPS.

ACKNOWLEDGMENTS

Studies in the authors' research unit were funded by The Medical Research Council of Canada. RMA is the recipient of a studentship from the Canadian Liver Foundation.

REFERENCES

- Audet, R.M. and Butterworth, R.F. (1996). Astrocytic function and cerebral energy metabolism are more severely compromised in old-adult rats compared to young-adult rats following portacaval anastomosis. *Hepatology* **24**:778 (abstract)
- Bergeron, M., Swain, M.S., Reader, T.A. and Butterworth, R.F. (1995). Regional alterations of dopamine and its metabolites in rat brain following portacaval anastomosis. *Neurochem. Res.* **20**:79-86.
- Bergeron, M., Swain, M.S., Reader, T.A., Grondin, L. and Butterworth, R.F. (1990). Effect of ammonia on brain serotonin metabolism in relation to function in the portacaval-shunted rat. *J. Neurochem.* **55**:222-229.
- Coy, D.L., Mehta, R., Zee, P., Salchli, F., Turek, F.W. and Blei, A.T. (1992). Portal-systemic shunting and the disruption of circadian locomotor activity in the rat. *Gastroenterol.* **103**:222-228.
- Cruz, N.F. and Diemel, G.A. (1994). Brain glucose levels in portacaval-shunted rats with chronic, moderate hyperammonemia: implications for determination of local cerebral glucose utilization. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **14**:113-124.
- Cruz, N.F. and Duffy, T.E. (1983). Local cerebral glucose metabolism in rats with chronic portacaval shunts. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **3**:311-320.
- De Waele, J.-P., Audet, R.M., Leong, D.K. and Butterworth, R.F. (1996). Portacaval anastomosis induces region-selective alterations of the endogenous opioid system in the rat brain. *Hepatology* **24**:895-901.
- Eklöf, B., Holmin, T., Johannsson, H. and Siesjö, B.K. (1974). Cerebral blood flow and cerebral metabolic rate for oxygen in rats with porta-caval anastomosis. *Acta Physiol. Scan.* **90**:337-344.

- Fan, P., Lavoie, J., Le, N.L., Szerb, J.C. and 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.
- Forman, D.T. (1964). Rapid determination of plasma ammonia by an ion-exchange technique. *Clin. Chem.* **10**:497-508.
- Giesen-Crouse, E. (1993). *Peripheral benzodiazepine receptors*, Academic Press, London.
- Giguère, J.F. and Butterworth, R.F. (1984). Amino acid changes in regions of the CNS in relation to function in experimental portal-systemic encephalopathy. *Neurochem. Res.* **9**:1309-1321.
- Giguère, J.F., Hamel, E. and Butterworth, R.F. (1992). Increased densities of binding sites for the 'peripheral-type' benzodiazepine receptor ligand [³H]PK 11195 in rat brain following portacaval anastomosis. *Brain Res.* **585**:295-298.
- Gines, P., Quintero, E., Arroyo, V., Teres, J., Bruguera, M., Rimola, A. and Caballeria, J. (1987). Compensated cirrhosis: natural history and prognostic factors. *Hepatology* **7**:122-128.
- Girard, G., Giguère, J.F. and Butterworth, R.F. (1993). Region-selective reductions in activities of glutamine synthetase in rat brain following portacaval anastomosis. *Metab. Brain Dis.* **8**:207-215.
- Itzhak, Y. and Norenberg, M.D. (1994). Ammonia-induced upregulation of peripheral-type benzodiazepine receptors in cultured astrocytes labeled with [³H]PK 11195. *Neurosci. Lett.* **177**:35-38.
- Kirzinger, S.S. and Fonda, M L. (1978). Glutamine and ammonia metabolism in the brains of senescent mice. *Exp. Gerontol.* **13**:255-261.

- Korneyev, A., Pan, B.S., Polo, A., Romeo, E., Guidotti, A. and Costa, E. (1993). Stimulation of brain pregnenolone synthesis by mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor ligands *in vivo*. *J. Neurochem.* **61**:1515-1524.
- Lai, J.C. and Cooper, A.J. (1986). Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *J. Neurochem.* **47**:1376-1386.
- Lee, S. H. and Fisher, B. (1961). Portocaval shunt in the rat. *Surgery* **50**:668-672.
- Lockwood, A.H., Ginsberg, M.D., Butler, C.M. and Gutierrez, M.T. (1982). Selective effects of ammonia on regional brain glucose metabolism. *Ann. Neurol.* **12**:114.
- Lockwood, A.H., Murphy, B.W., Donnelly, K.Z., Mahl, T.C. and Perini, S. (1993). Positron-emission tomographic localization of abnormalities of brain metabolism in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology* **18**:1061-1068.
- Lockwood, A.H., Yap, E.W., Rhoades, H.M. and 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. and Wong, W.H. (1991b). Cerebral ammonia metabolism in patients with severe liver disease and minimal hepatic encephalopathy [published erratum appears in *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1992 **12**:177]. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **11**:337-341.
- Mans, A.M., Biebuyck, J.F., Davis, D.W., Bryan, R.M. and Hawkins, R.A. (1983). Regional cerebral glucose utilization in rats with portacaval anastomosis. *J. Neurochem.* **40**:986-991.
- Mutchnick, M.G., Lerner, E. and Conn, H.O. (1974). Porto-systemic encephalopathy and portacaval anastomosis: a prospective controlled investigation. *Gastroenterol.* **66**:1005-1019.

- Nieto, C., Arias, J., Alsasua, A. and Garcia de Jalon, P D. (1980). Changes in brain oxidative metabolism in rats with portocaval shunt. *Experientia* **36**:1403-1404.
- O'Carroll, R.E., Hayes, P.C., Ebmeier, K.P., Dougall, N., Murray, C., Best, J.J., *et al.* (1991). Regional cerebral blood flow and cognitive function in patients with chronic liver disease. *Lancet* **337**:1250-1253.
- Paxinos, G. and Watson, C. (1982). *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press Australia, Sydney.
- Peterson, C., Giguère, J.F., Cotman, C.W. and Butterworth, R.F. (1990). Selective loss of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[³H]glutamate binding sites in rat brain following portacaval anastomosis. *J. Neurochem.* **55**:386-390.
- Pomier Layrargues, G., Huu Nguyen, N., Faucher, C., Giguère, J.F. and Butterworth, R.F. (1991). Sub-clinical hepatic encephalopathy in cirrhotic patients; prevalence and relationship to liver function. *Can. J. Gastroenterol.* **5**:121-125.
- Raabe, W. (1987). Synaptic transmission in ammonia intoxication. *Neurochem. Pathol.* **6**:145-66.
- Rao, V.L., Audet, R.M. and 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., Audet, R.M., Therrien, G. and Butterworth, R.F. (1994). Tissue-specific alterations of binding sites for peripheral-type benzodiazepine receptor ligand [³H]PK11195 in rats following portacaval anastomosis. *Digest. Dis. Sci.* **39**:1055-1063.
- Rossle, M., Haag, K., Ochs, A., Sellinger, M., Noldge, G., Perarnau, J.M., *et al.* (1994). The transjugular intrahepatic portosystemic stent-shunt procedure for variceal bleeding. *N. Engl. J. Med.* **330**:165-171.

- Sanyal, A.J., Freedman, A.M., Shiffman, M.L., Purdum, P., Luketic, V.A. and Cheatham, A.K. (1994). Portosystemic encephalopathy after transjugular intrahepatic portosystemic shunt: results of a prospective controlled study. *Hepatology* **20**: 46-55
- Schmidt, F.H. (1961) Die enzymatische bestimmung von glucose und fructose nebeneinander. *Klinische Wochenschrift* **39**:1244.
- Shiffman, M.L., Jeffers, L., Hoofnagle, J.H. and Sue Tralka, T. (1995). The role of transjugular intrahepatic portosystemic shunt for treatment of portal hypertension and its complications: A conference sponsored by the National Digestive Diseases Advisory Board. *Hepatology* **22**:1591-1597.
- Smith, C.B., Goochee, C., Rapoport, S.I. and Sokoloff, L. (1980). Effects of aging on local rates of cerebral glucose utilization in the rat. *Brain* **103**:351-365.
- Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., Mh, D.R., Patlak, C.S., Pettigrew, K.D., et al. (1977). The [¹⁴C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J. Neurochem.* **28**:897-916.
- Somberg, K.A., Jonathan, M.D. and Riegler, M.D. (1995). Hepatic encephalopathy after transjugular intrahepatic portosystemic shunts: incidence and risk factors. *Am. J. Gastroenterol.* **90**:549-555.
- Tarter, R.E., Hegedus, A.M., Van, T.D., Schade, R.R., Gavalier, J.S. and Starzl, T.E. (1984). Nonalcoholic cirrhosis associated with neuropsychological dysfunction in the absence of overt evidence of hepatic encephalopathy. *Gastroenterol.* **86**:1421-1427.
- Therrien, G., Rose, C. and Butterworth, R.F. (1995). Early loss of day-night rhythms following portacaval anastomosis in the rat. In (Capocaccia L., Merli M. and Riggio O. eds.) *Advances in hepatic encephalopathy and nitrogen exchange*, CRC press Inc., Boca Raton, 304-307.

2.3 Article 2

Alterations of astrocyte morphology and of "peripheral-type" benzodiazepine receptor sites in brain following portacaval anastomosis: effect of aging.

Metabolic Brain Disease (Soumis)

Robert M. Audet¹ and Roger F. Butterworth^{1,2}

¹ Neuroscience Research Unit, CHUM pavillon Saint-Luc (University of Montreal), Montréal, Québec, Canada

² To whom correspondence should be addressed at Neuroscience Research Unit, CHUM pavillon Saint-Luc, 1058 St-Denis Street, Montréal, Québec H2X 3J4 Canada,

ABSTRACT

Hepatic Encephalopathy (HE) remains a major neuropsychiatric complication of portal decompressive surgery or transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS) in humans with chronic liver disease. Post-TIPS encephalopathy is particularly prevalent in older patients. As part of a series of studies to elucidate the neurobiological mechanisms responsible for the increased prevalence of cerebral dysfunction in older individuals following portal decompressive surgery, the effects of end-to-side portacaval anastomosis (PCA) on the binding of ^3H -PK11195, a specific antagonist ligand for the "peripheral-type" benzodiazepine receptor was evaluated in brain regions of 3-month old (young adult) and 25-month old (old adult) rats. Autoradiographic measurements of the density of binding sites for ^3H -PK11195 revealed a significant increase in the PCA group compared to the control group for all brain regions sampled ($p < 0.001$). Significantly greater increases were observed in old versus young adult rats following PCA ($p < 0.001$); the largest increase was in fronto-parietal (205% increase) and frontal (102% increase) cortices respectively. Alzheimer type-II astrocytosis, the histological hallmark of HE, appeared in old adult rats following PCA. However, there were no significant changes in blood ammonia levels in either age groups of PCA animals, suggesting a greater vulnerability of astrocytic mitochondria in older rats to comparable increases of ammonia. Given the established role of the "peripheral-type" benzodiazepine receptor in central nervous system excitability and function, the greater increase in ligand binding sites of this receptor in old versus young animals following portacaval anastomosis could explain the high prevalence of encephalopathy in old adult animals following PCA. Similar mechanisms could be implicated in the pathogenesis of post-TIPS encephalopathy in older cirrhotic patients.

INTRODUCTION

Ascites and esophageal varices leading to severe hemorrhage are the consequence of portal hypertension in chronic liver disease. These complications can now be successfully treated by a decompressive surgery or transjugular intrahepatic portosystemic stent shunt (TIPS). Unfortunately the TIPS procedure is complicated by the development of new or worsening episodes of hepatic encephalopathy (HE) in up to 40% of cases (Mutchnick *et al.* 1974; Gines *et al.* 1987; Rossle *et al.* 1994; Sanyal *et al.* 1994). Recent prospective studies have shown that the overall risk of post-TIPS encephalopathy is increased in patients with prior history of HE, a large diameter shunt and advanced age (Rossle *et al.* 1994; Shiffman *et al.* 1995; Somberg *et al.* 1995). Clinically significant encephalopathy has been described in 40% of patients over the age of 60 years following TIPS (Rossle *et al.* 1994).

Two classes of benzodiazepine receptors, both of which are implicated in the control of central nervous system excitability, have been described in mammalian tissue: 1) the central-type receptor coupled to the GABA_A receptor and a chloride channel, located on neurons, 2) the so-called "peripheral-type" benzodiazepine receptors (PTBR) first localized in peripheral organs such as heart, kidney, liver, testes, adrenals and later found in brain. These multimeric PTBRs are localized on mitochondria where they span both inner and outer membranes (McEnery *et al.* 1992), and in brain, they are predominantly astrocytic in localization (Bender and Hertz 1987). There is evidence that alterations of PTBR as well as their endogenous ligands are involved in the pathophysiology of chronic HE. Binding sites for ³H-PK11195, a highly selective ligand for the PTBR, have been reported to be increased following

portacaval anastomosis (PCA) in rats and in autopsied brain tissue from patients who died in hepatic coma (Lavoie *et al.* 1990; Giguère *et al.* 1992; Leong *et al.* 1994). Furthermore, concentrations of diazepam binding inhibitor (DBI) and its active metabolite octadecaneuropeptide (ODN), both putative endogenous ligands for PTBRs, have been shown to be increased in human HE (Rothstein *et al.* 1989) or following PCA in the rat (Butterworth *et al.* 1991).

In order to further elucidate the neurobiologic basis for the increased sensitivity of brain to portal-systemic shunting, the effect of portacaval anastomosis on astrocytic integrity and, in particular, on PTBR, was studied in 3 month-old (young adult) versus 25 month-old (old adult) rats. Cell counts were performed on cresyl violet and GFAP stained sections in all groups to evaluate the extent of astrocyte proliferation and the prevalence of Alzheimer type II astrocytosis. Binding sites for ^3H -PK11195 were found to be significantly increased in older control animals compared to their younger counterparts. Furthermore, a significant increase was observed in the old (versus young) group following PCA in the majority of brain regions studied.

MATERIALS AND METHODS

Animal surgery

All surgical procedures were conducted (and animals were cared for) in accordance with the 1984 *Principles of the Guide for the Care and Use of Experimental Animals*, Vol. 2 of the Canadian Council on Animal Care, Ottawa.

Groups of 2 month-old and 24 month-old male Sprague-Dawley rats (n=7 per group) were anesthetized with halothane, and an end-to-side portacaval

anastomosis was performed according to established guidelines (Lee and Fisher 1961). Briefly, rats underwent a laparotomy, the inferior vena cava and portal vein were isolated, the inferior vena cava was partially clamped (anastomosis clamp; Roboz Instruments) and an elliptical piece of vein, 1.5 times the portal vein diameter, was removed. The portal vein was ligated, cut, and an end-to-side anastomosis was performed using 7-0 silk suture under a dissecting microscope. Total surgery time was less than 15 min. and overall mortality for shunted rats was <2%. Two additional groups of rats (n=7 each of 2 month-old and 24 month-old Sprague-Dawley rats, weight-matched with the above groups) were similarly anesthetized, a laparotomy was performed, and the inferior vena cava and portal vein were clamped for 15 min., these animals served as controls. Following surgery, all animals were kept under constant conditions of temperature, humidity and light cycles and were allowed free access to standard laboratory chow and water. All portacaval shunts were tested by retrograde injection of saline into the inferior vena cava at the time of killing and were found to be patent.

Histology and immunohistochemistry

Four weeks after surgery, the rats were decapitated, the brains were rapidly removed and frozen in liquid nitrogen. Neck blood was collected into heparinized tubes and centrifuged for ammonia determination using an ion-exchange resin technique (Forman 1964). 20 μm brain sections were then thaw-mounted onto gelatin-coated glass cover slips. For astroglial counts, cresyl violet stained astrocytes were counted in five randomly chosen cortical fields of 0.025 mm²/image from three different sections in the same animal. Cresyl violet sections were counted a second time in the same manner and

counts were averaged for each rat. Alzheimer type II astrocytes were counted in the same way as described above and defined as a large nucleus with marginated chromatin and a watery appearance as previously described (Norenberg 1977). All quantifications were done by an investigator who was unaware of the treatment groups.

³H -PK11195 Autoradiography

Slides were incubated 1 h. at 25°C in 170 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 1 nM ³H-PK11195 (specific activity 85.0 Ci/mmol, New England Nuclear). For non-specific binding, adjacent sections were incubated in the same solution with the addition of 1 μM cold PK11195 (Research Biochemical Inc., Natick, MA). The incubation was terminated by rinsing 3 times in ice-cold buffer for 5 min. Sections were dipped briefly in cold distilled water and dried rapidly under a stream of air. Dried sections were exposed to Hyperfilm™ for 3 weeks at 4°C along with methyl-methacrylate radioactive standards (Amersham microscaler). Regions of interest were localized with the help of adjacent sections stained with cresyl violet (Nissl stain) in accordance with an established rat brain atlas (Paxinos and Watson 1982). Optical density measurements were done with an imaging system (MCID, St-Catharines, Ont.).

Immunoblot analysis

Cortical tissues were homogenized 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., 50 μg of protein extracts

were boiled for 5 min. in loading buffer (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10 % glycerol, 2% SDS, 0.1 M dithiothreitol, 0.1% bromophenol blue). Proteins were resolved by 8% denaturing SDS-polyacrylamide gels along with rainbow molecular mass markers and transferred overnight to nitrocellulose filters. The membranes were blocked for 2 h at room temperature in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST) containing 5% nonfat dry milk. The membrane was then incubated for 1 h with either anti-GS (0.25 µg/ml) or anti-GFAP (0.05 µg/ml). The blots were subsequently probed with anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated antiserum in the same buffer. After extensive washing with TBST, the peroxidase activity was detected by chemiluminescence using the ECL detection system (Amersham, Arlington Heights, IL).

The density of immunoreactive bands was quantified with an imaging system (MCID, St-Catharines, Ont.) and expressed as relative optical density (ROD).

Statistical analysis

For each brain region studied, specific binding was compared for the two variables (age and portacaval shunting) using a two way analysis of variance (ANOVA) followed by a post hoc Tukey test. A two-way ANOVA was also used for physiological parameters and cell counts, followed by a post hoc Tukey test.

RESULTS

Effect of portacaval anastomosis on liver weight

Both PCA groups (young and old) showed significant liver atrophy when compared to the control groups (Table 2.1). Blood ammonia levels in both groups of shunted animals (young and old) showed an equivalent increase of approximately 160% ($p < 0.05$) compared to controls. These values showed good agreement with those previously reported in young portacaval-shunted rats (Girard *et al.* 1993).

Table 2.3 Liver/body weight and blood ammonia concentrations in 3 month and 25 month-old rats four weeks after portacaval anastomosis (shunt) or sham operation.

Parameter	Young			Old		
	Sham	Shunt	% change	Sham	Shunt	% change
Body weight (g)	421 ± 25	298 ± 19*	-29 %	705 ± 24†	527 ± 23*††	-25 %
Liver weight (g)	14.4 ± 0.9	6.1 ± 0.7*	-58 %	21.8 ± 1.1†	8.0 ± 0.8*	-63 %
Ammonia (µg/dl)	140 ± 20	380 ± 40*	+171 %	160 ± 30	410 ± 40*	+156 %

Values are mean ± S.E.M. from 7 animals per treatment group. Significant differences between portacaval shunted and sham-operated control values within the same age group are indicated by * $p < 0.05$. Significant differences between young and old rats within the same treatment group (shunt or sham) indicated by † $p < 0.05$ and †† $p < 0.001$, by analysis of variance with Tukey post hoc test.

Histological findings

Histopathological evaluation revealed no evidence of astrocytic proliferation in cortical sections of either PCA or control rats of either age group. 25 month-old PCA rats had an average of 32.4 ± 2.8 astrocytes/field, 25 month-old controls had 31.3 ± 4.6 astrocytes/field, 3 month-old PCA rats had an average of 30.0 ± 3.9 astrocytes/field and 3 month-old controls had 34.1 ± 4.3 astrocytes/field.

Alzheimer type II astrocytes were found in 25 month-old PCA rats ($12.8/\text{field} \pm 3.4$, $p < 0.05$) and rarely in 25 month-old controls ($2.1/\text{field} \pm 1.7$) (Figure 2.3). Few Alzheimer type II astrocytes were observed in 3 month-old PCA ($2.9/\text{field} \pm 1.4$) and was virtually absent in 3 month-old controls.

³H-PK11195 Binding sites

A significant increase of ³H-PK11195 binding sites was found in the old control group compared to the young control group in nucleus accumbens (127%), caudate/putamen (142%), frontal cortex (232%), frontoparietal cortex (160%), and thalamus (64%) (Table 2.4)

PCA led to a significant increase in the density of ³H-PK11195 binding sites in all brain regions studied in both age groups, confirming previous findings in young adult animals (Leong *et al.* 1994; Rao *et al.* 1994). In nucleus accumbens, PCA resulted in a 229% ($p < 0.01$) increase in ³H-PK11195 binding sites in young and a 125% ($p < 0.01$) in the old rats (Table 2.2).

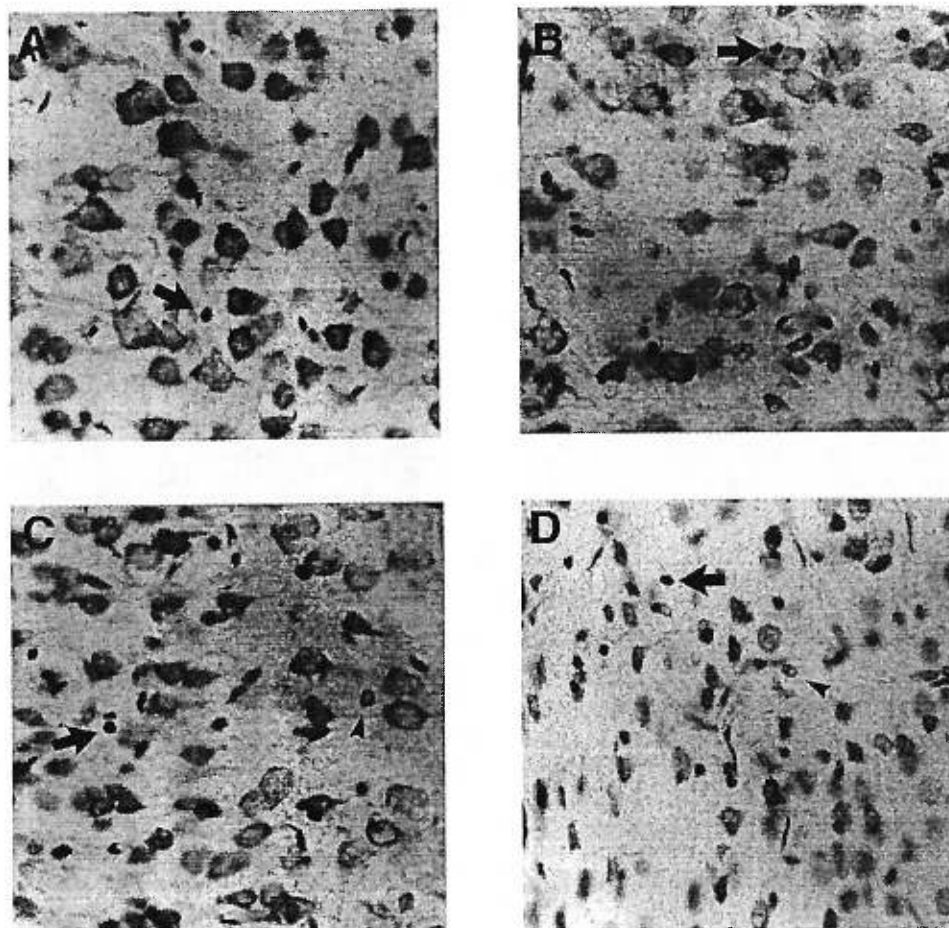


Figure 2.3 Representative photomicrographs after cresyl violet staining for identification and counting of astrocytes in the frontal cortex. **A:** from a 3 month-old control rat **B:** from a 3 month-old rat with portacaval anastomosis **C:** from a 25 month-old control rat and **D:** from a 25 month-old rat with portacaval anastomosis. There is no apparent change in normal astrocytes (arrows) four weeks after portacaval anastomosis or with age. Alzheimer type II astrocytes can be seen (arrowheads) in the old rats and old controls. All photographs were taken at 500 X original magnification.

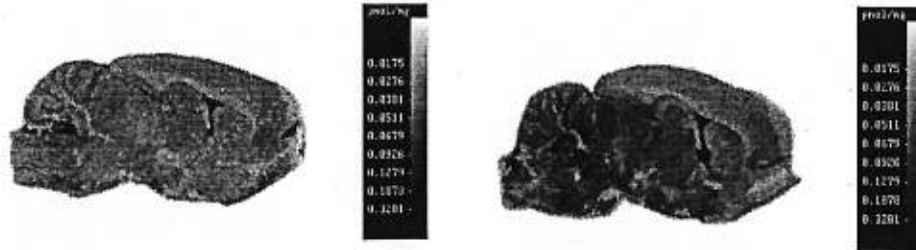
Table 2.4 Specific binding of ^3H -PK11195 (fmol/mg tissue) in 3 month and 25 month-old rats four weeks after portacaval anastomosis (shunt) or sham operation.

Region	Young			Old		
	Sham	Shunt	% change	Sham	Shunt	% change
Frontal cortex	7.4±1.5	23.8±3.5	221 %	24.6±5.5	48.0±6.9**††	95 %
Frontoparietal cortex	6.1±2.0	19.1±2.4	213 %	15.9±4.1	58.0±7.5**††	265 %
Thalamus	7.4±0.9	35.9±4.5**	385 %	12.1±2.7	55.6±6.3**††	360 %
Accumbens	7.8±1.8	25.5±4.3*	227 %	17.6±4.6	39.6±4.9*	125 %
Caudate/Putamen	6.7±3.6	18.6±4.5	178 %	16.2±5.1	27.5±4.9	70 %

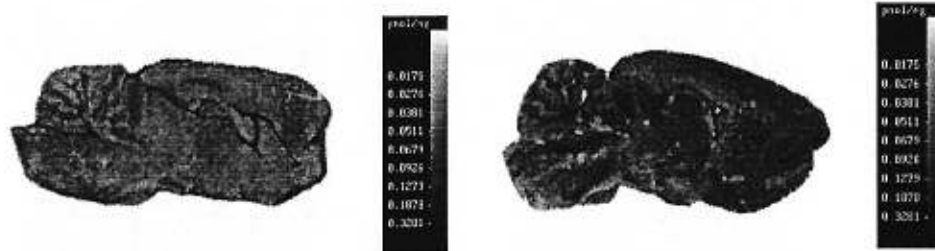
Values are expressed as fmol/mg and represent the mean \pm S.E.M. of three sections per rat from 7 animals per treatment group. Significant differences between shunt and sham values within the same age group are indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. Significant difference between young and old rats within the same treatment group (shunt or sham) indicated by † $p < 0.05$, and †† $p < 0.001$ by analysis of variance with Tukey post-hoc test.

Large increases were also found in the frontal cortex (220%, $p < 0.05$ and 95%, $p < 0.05$), in the fronto-parietal cortex (211%, $p < 0.05$ and 265%, $p < 0.001$) and the thalamus (384%, $p < 0.001$ and 359%, $p < 0.001$) of young PCA versus old PCA rats respectively (Table 2.4). A similar trend was observed in the caudate putamen (Figure 2.4).

Jeunes



Vieux



Sham

Shunt

Figure 2.4 Representative ^3H -PK11195 autoradiograms from mid-sagittal sections of brains of young and old adult rats following portacaval anastomosis or sham operation.

GFAP and GS immunoblot analysis

No significant changes were noted for the expression of GFAP in the frontal cortex of all four groups (Figure 2.5). Similarly, no changes in cortical GS expression were observed in old controls and PCA rats (Figure 2.6).

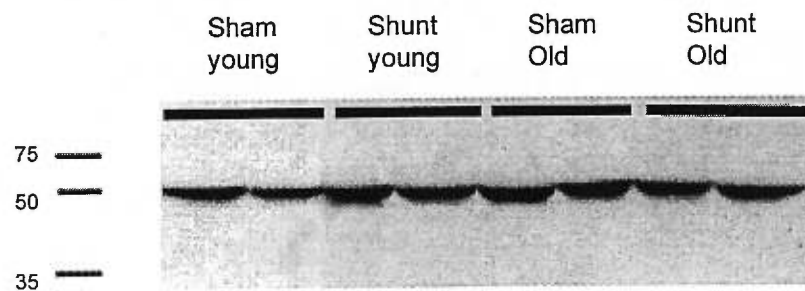


Figure 2.5 Western blot analysis of glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in cerebral cortex of old adult rats four weeks following portacaval anastomosis (455.3 ± 51.5 R.O.D.) or sham operation (221.5 ± 48.7 R.O.D.). Each lane was loaded with 50 μ g of protein and resolved on a 8% denaturing SDS-polyacrylamide gel and transferred overnight to nitrocellulose filters. The membranes were blocked for 2 h. with Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 containing 5% nonfat dry milk and incubated with anti GFAP (0.05 μ g/ml) then with anti-mouse horse radish peroxidase conjugated anti-serum and visualized using enhanced chemiluminescence.

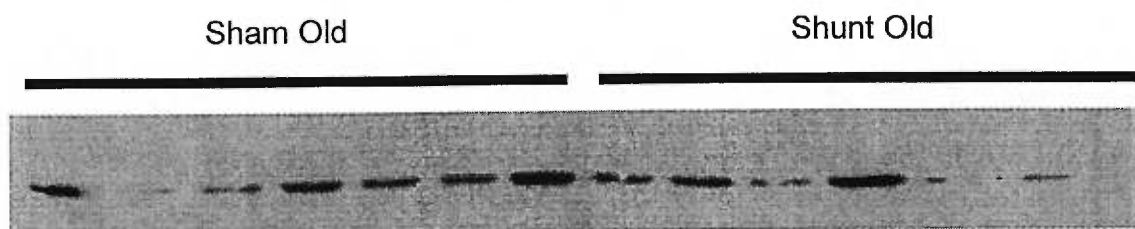


Figure 2.6 Western blot analysis of glutamine synthetase (GS) expression in cerebral cortex of old adult rats four weeks following portacaval anastomosis. Each lane was loaded with 50 μg of protein and resolved on a 8% denaturing SDS-polyacrylamide gel and transferred overnight to nitrocellulose filters. The membranes were blocked for 2 h. with Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 containing 5% nonfat dry milk and incubated with anti GS (0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) then with anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated antiserum and visualized using enhanced chemiluminescence.

DISCUSSION

Results of the present study reveal the appearance of Alzheimer type II astrocytosis in old PCA rats and show both age-dependent and PCA-dependent increases of the binding of ^3H -PK11195 to PTBRs in the rat brain. Alzheimer type II changes were observed in a third of cortical astrocytes of old

rats following PCA, whereas in young PCA animals they represented a significantly smaller portion of cortical astrocytes, suggesting an increased vulnerability of the aged brain to the deleterious effects of PCA. Binding site densities were increased two-fold in old versus young adult animals, and three-fold following PCA. However, no concomitant increases in the number of cortical astrocytes were observed as a function either of age or PCA, suggesting that PCA in both young and old adult animals results in increased PTBR sites per astrocyte. The finding of increased receptor sites in young adult rats following PCA confirms previous reports (Giguère *et al.* 1992; Desjardins *et al.* 1997; 1999).

Alzheimer type II astrocytosis is considered the histological hallmark of HE and seems to be directly related to increased ammonia levels (Norenberg 1977; Martin *et al.* 1987). This view is strengthened by the fact that Alzheimer type II astrocytes also appear in patients with normal hepatic function but elevated plasma levels of ammonia (Bruton *et al.* 1970; Lewis and Miller 1970; Boogerd *et al.* 1990). Severe Alzheimer type II astrocytosis appear in old PCA rats whereas mild changes occur in young PCA rats, although both of these groups had similar elevations of plasma ammonia levels. This could represent either an increased vulnerability of the aging brain to similar ammonia levels, or reflect increased cerebral ammonia concentrations observed with aging (Kirzinger and Fonda 1978; Rajeswari and Radha 1984). This could also explain the appearance of Alzheimer type II astrocytes in aged control animals, specially if the 60% (Kirzinger and Fonda 1978), or 95% (Rajeswari and Radha 1984) increase in ammonia concentrations observed in normal aging occurs preferentially in astrocytes. Further studies are required to evaluate cerebral ammonia levels in aged animals following PCA in order to address this possibility.

It has been shown that in the brain of cirrhotic patients (Lockwood *et al.* 1991) and PCA rats (Gjedde *et al.* 1978; Dejong *et al.* 1993) there is an increase in the uptake and metabolism of ammonia. Although plasma ammonia levels in aged PCA rats were similar to young PCA animals, the permeability of the blood brain barrier to ammonia, or its metabolism, might be changed in older animals. Reports of increased brain ^3H -PK11195 binding in congenital hyperammonemic syndromes support the view that increases in these binding sites are most likely related to the astrocytic response to chronic hyperammonemia (Rao *et al.* 1993). Ammonia in cortical brain extracts from senescent mice was shown to be increased (Kirzinger and Fonda 1978; Rajeswari and Radha 1984) along with the ammonia detoxification product, glutamine (Kirzinger and Fonda 1978). PCA in 25 month-old rats resulted in more than a two fold increase in glutamine compared to 3 month-old PCA (unpublished data), probably in response to increased brain ammonia levels.

In view of the generally held view that PTBR are highly localized on mitochondria (Krueger and Papadopoulos 1992), alterations of the binding sites for ^3H -PK11195 could reflect mitochondrial changes seen both in normal aging (Wei *et al.* 1998) and following PCA (Norenberg 1977).

The present finding of increased brain PTBRs in normal aging confirms previous reports. For example, an increase in binding of ^3H -PK11195 was found in the parietal cortex of 22 month-old compared to 3 month-old Fisher rats (Benavides *et al.* 1990). In an independent study, ^3H -diazepam binding displaced by the PTBR agonist ligand Ro5-6669, was reportedly increased 3-fold in the cerebellum of 28 month-old Fisher 344 rats (Komiskey and MacFarlan 1983). Interestingly, an endogenous glial heme iron-mediated peroxidase activity was shown to increase with normal aging (Schipper 1991).

Since PTBRs have been implicated in the transport of heme into mitochondria (Taketani *et al.* 1995), these increases in heme and PTBRs with age might be related. Further studies are needed to determine if the increase in glial PTBR is associated with heme accumulation in mitochondria of PCA rats.

The transport of cholesterol, the rate limiting step in neurosteroid synthesis, from the outer to the inner mitochondrial membrane is enhanced by the activation of PTBRs by their endogenous ligand, diazepam binding inhibitor (DBI) (Papadopoulos and Brown 1995). Since most neurosteroids are potent agonists of the GABA_A receptor (Majewska 1992), it has been proposed that increased expression of PTBRs and DBI in HE (Rothstein *et al.* 1989; Desjardins *et al.* 1997) could lead to increased GABAergic tone and thus explain the reduced levels of consciousness observed in this disorder (Sanyal *et al.* 1994). Further studies are required to assess the effects of PCA on neurosteroid-associated GABA_A receptor function in order to evaluate this possibility.

Increasing evidence suggests that manganese accumulation in brain of cirrhotic patients could contribute to the pathogenesis of HE. Indeed, manganese has been shown to increase in globus pallidus of cirrhotic patients who died in hepatic coma (Pomier Layrargues *et al.* 1995), and in PCA rats (Rose *et al.* 1999). Serum concentrations of this metal are increased in cirrhotic patients who manifest pallidal T1-weighted Magnetic Resonance Imaging (MRI) signal hyperintensities (Spahr *et al.* 1996), a feature present in 80% of cirrhotic patients (Kulisevsky *et al.* 1992). Furthermore, recent findings in astrocytic cultures suggest that manganese up-regulates ³H-PK11195 binding sites by a process not involving changes in transcription (Hazell *et al.* 1999). Moreover, brain manganese levels have been shown to be higher in 6

month-old than 3 month-old rats (Takeda *et al.* 1996). Higher manganese concentration could therefore contribute to the greater vulnerability of the aging brain to portal-systemic shunting via a mechanism involving activation of PTBRs.

Astrocytic changes observed here in old PCA rats, namely appearance of Alzheimer type II astrocytes and increased ^3H -PK11195 binding, are not the result of global changes in protein synthesis in astrocytes. This is evidenced by the fact that GFAP and GS, two exclusively astrocytic proteins, are not altered in old PCA rats suggesting specific mechanisms of actions of toxins. The morphological alterations of astrocytes in aged rats following PCA could be the result of functional changes underlying an increased susceptibility of old animals to the effects of PCA.

In summary, results of the present study reveal significant increases in binding sites for the astrocytic PTBR ligand ^3H -PK11195 following PCA in old versus young adult rats in nucleus accumbens, frontal cortex, frontoparietal cortex and thalamus. Severe Alzheimer type II astrocytosis appeared in the frontal cortex of old rats following PCA, whereas only small such changes could be observed in young PCA rats. These age-related changes were not the result of greater increases of blood ammonia concentrations in these animals, nor of astrocyte proliferation. In view of the role of PTBRs in the control of central nervous system excitability, these results are consistent with previous reports of a more widespread metabolic deficit in the brains of older rats following PCA (Audet and Butterworth 1998). Similar mechanisms could be involved in the higher incidence of encephalopathy in older cirrhotic patients following TIPS.

ACKNOWLEDGMENTS

Studies in the author's research unit were funded by The Medical Research Council of Canada. RMA was the recipient of a studentship from the Canadian Liver Foundation.

REFERENCES

- Audet, R. M. and Butterworth, R. F. (1998). Portacaval anastomosis results in more widespread alterations of cerebral metabolism in old versus young adult rats: implications for post-shunt encephalopathy. *Metabolic Brain Disease* **13** (1): 69-78.
- Benavides, J., Capdeville, C., Dauphin, F., Dubois, A., Duverger, D., Fage, D., Gotti, B., MacKenzie, E. T., *et al.* (1990). The quantification of brain lesions with an omega 3 site ligand: a critical analysis of animal models of cerebral ischaemia and neurodegeneration. *Brain Research* **522** (2): 275-89.
- Bender, A. S. and Hertz, L. (1987). Pharmacological characteristics of diazepam receptors in neurons and astrocytes in primary cultures. *Journal of Neuroscience Research* **18** (2): 366-72.
- Boogerd, W., Zoetmulder, F. A. and Moffie, D. (1990). Hyperammonemic encephalopathy due to suture line breakdown after bladder operation. *Clinical Neurology & Neurosurgery* **92** (3): 255-7.
- Bruton, C. J., Corsellis, J. A. and Russell, A. (1970). Hereditary hyperammonaemia. *Brain* **93** (2): 423-34.
- Butterworth, R. F., Tonon, M. C., Desy, L., Giguère, J. F., Vaudry, H. and Pelletier, G. (1991). Increased brain content of the endogenous benzodiazepine receptor ligand, octadecaneuropeptide (ODN), following portacaval anastomosis in the rat. *Peptides* **12** (1): 119-25.

- Dejong, C. H., Deutz, N. E. and Soeters, P. B. (1993). Cerebral cortex ammonia and glutamine metabolism in two rat models of chronic liver insufficiency-induced hyperammonemia: influence of pair-feeding. *Journal of Neurochemistry* **60** (3): 1047-57.
- Desjardins, P., Bandeira, P., Raghavendra, R. V., Ledoux, S. and Butterworth, R. F. (1997). Increased expression of the peripheral-type benzodiazepine receptor-isoquinoline carboxamide binding protein mRNA in brain following portacaval anastomosis. *Brain Research* **758** (1-2): 255-8.
- Desjardins, P., Bandeira, P., Rao, V. and Butterworth, R. F. (1999). Portacaval anastomosis causes selective alterations of peripheral-type benzodiazepine receptor expression in rat brain and peripheral tissues. *Neurochemistry International* **35** (4): 293-299.
- Forman, D. T. (1964). Rapid determination of plasma ammonia by an ion-exchange technique. *Clinical Chemistry* **10** (6): 497-508.
- Giguère, J. F., Hamel, E. and Butterworth, R. F. (1992). Increased densities of binding sites for the 'peripheral-type' benzodiazepine receptor ligand [³H]PK 11195 in rat brain following portacaval anastomosis. *Brain Research* **585** (1-2): 295-8.
- Gines, P., Quintero, E., Arroyo, V., Teres, J., Bruguera, M., Rimola, A. and Caballeria, J. (1987). Compensated cirrhosis: natural history and prognostic factors. *Hepatology* **7** 122-128.
- Girard, G., Giguère, J. F. and Butterworth, R. F. (1993). Region-selective reductions in activities of glutamine synthetase in rat brain following portacaval anastomosis. *Metabolic Brain Disease* **8** (4): 207-15.
- Gjedde, A., Lockwood, A. H., Duffy, T. E. and Plum, F. (1978). Cerebral blood flow and metabolism in chronically hyperammonemic rats: effect of an acute ammonia challenge. *Annals of Neurology* **3** (4): 325-30.
- Hazell, A. S., Desjardins, P. and Butterworth, R. F. (1999). Chronic exposure of rat primary astrocyte cultures to manganese results in increased binding sites for the 'peripheral-type' benzodiazepine receptor ligand H-3-PK 11195. *Neuroscience Letters* **271** (1): 5-8.

- Kirzinger, S. S. and Fonda, M. L. (1978). Glutamine and ammonia metabolism in the brains of senescent mice. *Experimental Gerontology* **13** (3-4): 255-61.
- Komiskey, H. L. and MacFarlan, M. F. (1983). Effect on neuronal and non-neuronal benzodiazepine binding sites. *Neurochemical Research* **8** (9): 1135-41.
- Krueger, K. E. and Papadopoulos, V. (1992). Mitochondrial benzodiazepine receptors and the regulation of steroid biosynthesis. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology* **32** (211): 211-37.
- Kulisevsky, J., Pujol, J., Balanzo, J., Junque, C., Deus, J., Capdevilla, A. and Villanueva, C. (1992). Pallidal hyperintensity on magnetic resonance imaging in cirrhotic patients: clinical correlations. *Hepatology* **16** (6): 1382-8.
- Lavoie, J., Layrargues, G. P. and Butterworth, R. F. (1990). Increased densities of "peripheral-type" benzodiazepine receptors in brain autopsy samples from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Hepatology* **11** (5): 874-8.
- Lee, S. H. and Fisher, B. (1961). Portocaval shunt in the rat. *Surgery* **50** 668-72.
- Leong, D. K., Therrien, G., Swain, M. S. and Butterworth, R. F. (1994). Densities of binding sites for the "peripheral-type" benzodiazepine receptor ligand ^3H -PK11195 are increased in brain 24 hours following portacaval anastomosis. *Metabolic Brain Disease* **9** (3): 267-73.
- Lewis, P. D. and Miller, A. L. (1970). Argininosuccinic aciduria. Case report with neuropathological findings. *Brain* **93** (2): 413-22.
- Lockwood, A. H., Yap, E. W. and Wong, W. H. (1991). Cerebral ammonia metabolism in patients with severe liver disease and minimal hepatic encephalopathy [published erratum appears in J Cereb Blood Flow Metab 1992 Jan;12(1):177]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **11** (2): 337-41.

- Majewska, M. D. (1992). Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Progress in Neurobiology* **38** (4): 379-95.
- Martin, H., Voss, K., Hufnagl, P., Wack, R. and Wassilew, G. (1987). Morphometric and densitometric investigations of protoplasmic astrocytes and neurons in human hepatic encephalopathy. *Experimental Pathology* **32** (4): 241-50.
- McEneaney, M. W., Snowman, A. M., Trifiletti, R. R. and Snyder, S. H. (1992). Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89** (8): 3170-4.
- Mutchnick, M. G., Lerner, E. and Conn, H. O. (1974). Porto-systemic encephalopathy and portacaval anastomosis: a prospective controlled investigation. *Gastroenterology* **66** 1005-19.
- Norenberg, M. D. (1977). A light and electron microscopic study of experimental portal-systemic (ammonia) encephalopathy. Progression and reversal of the disorder. *Laboratory Investigation* **36** (6): 618-27.
- Norenberg, M. D., Neary, J. T., Norenberg, L. O. and McCarthy, M. (1990). Ammonia induced decrease in glial fibrillary acidic protein in cultured astrocytes. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **49** (4): 399-405.
- Papadopoulos, V. and Brown, A. S. (1995). Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **53** (1-6): 103-10.
- Paxinos, G. and Watson, C. (1982). The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney, Academic Press Australia.
- Pomier Layrargues, G., Spahr, L. and Butterworth, R. F. (1995). Increased manganese concentrations in pallidum of cirrhotic patients. *Lancet* **345** (8951):

- Rajeswari, T. S. and Radha, E. (1984). Metabolism of the glutamate group of amino acids in rat brain as a function of age. *Mechanisms of Ageing & Development* **24** (2): 139-49.
- Rao, V. L., Audet, R. M., Therrien, G. and Butterworth, R. F. (1994). Tissue-specific alterations of binding sites for peripheral-type benzodiazepine receptor ligand [³H]PK11195 in rats following portacaval anastomosis. *Digestive Diseases & Sciences* **39** (5): 1055-63.
- Rao, V. L., Qureshi, I. A. and Butterworth, R. F. (1993). Increased densities of binding sites for the peripheral-type benzodiazepine receptor ligand [³H]PK 11195 in congenital ornithine transcarbamylase-deficient sparse fur mouse. *Pediatric Research* **34** (6): 777-80.
- Rose, C., Butterworth, R. F., Zayed, J., Normandin, L., Todd, K., Michalak, A., Spahr, L., Huet, P. M., *et al.* (1999). Manganese deposition in basal ganglia structures results from both portal-systemic shunting and liver dysfunction. *Gastroenterology* **117** (3): 640-4.
- Rossle, M., Haag, K., Ochs, A., Sellinger, M., Noldge, G., Perarnau, J. M., Berger, E., Blum, U., *et al.* (1994). The transjugular intrahepatic portosystemic stent-shunt procedure for variceal bleeding. *New England Journal of Medicine* **330** (3): 165-71.
- Rothstein, J. D., McKhann, G., Guarneri, P., Barbaccia, M. L., Guidotti, A. and Costa, E. (1989). Cerebrospinal fluid content of diazepam binding inhibitor in chronic hepatic encephalopathy. *Annals of Neurology* **26** (1): 57-62.
- Sanyal, A. J., Freedman, A. M., Shiffman, M. L., Purdum, P. 3., Luketic, V. A. and Cheatham, A. K. (1994). Portosystemic encephalopathy after transjugular intrahepatic portosystemic shunt: results of a prospective controlled study. *Hepatology* **20** 46-55.
- Schipper, H. M. (1991). Gomori-positive astrocytes: biological properties and implications for neurologic and neuroendocrine disorders. *Glia* **4** (4): 365-77.

- Shiffman, M. L., Jeffers, L., Hoofnagle, J. H. and Sue Tralka, T. (1995). The role of transjugular intrahepatic portosystemic shunt for treatment of portal hypertension and its complications: A conference sponsored by the National Digestive Diseases Advisory Board. *Hepatology* **22** (5): 1591-97.
- Somberg, K. A., Riegler, J. L., LaBerge, J. M., Doherty-Simor, M. M., Bachetti, P., Roberts, J. P. and Lake, J. R. (1995). Hepatic encephalopathy after transjugular intrahepatic portosystemic shunts: incidence and risk factors. *American Journal of Gastroenterology* **90** (4): 549-55.
- Spahr, L., Butterworth, R. F., Fontaine, S., Bui, L., Therrien, G., Milette, P. C., Lebrun, L. H., Zayed, J., *et al.* (1996). Increased blood manganese in cirrhotic patients: relationship to pallidal magnetic resonance signal hyperintensity and neurological symptoms. *Hepatology* **24** (5): 1116-20.
- Takeda, T., Kimura, M., Yokoi, K. and Itokawa, Y. (1996). Effect of age and dietary protein level on tissue mineral levels in female rats. *Biological Trace Element Research* **54** (1): 55-74.
- Taketani, S., Kohno, H., Furukawa, T. and Tokunaga, R. (1995). Involvement of peripheral-type benzodiazepine receptors in the intracellular transport of heme and porphyrins. *Journal of Biochemistry* **117** (4): 875-80.
- Wei, Y. H., Lu, C. Y., Lee, H. C., Pang, C. Y. and Ma, Y. S. (1998). Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. *Annals of the New York Academy of Sciences* **854** (155): 155-70.

Article 3

Increased glutamate transporter (GLT-1) sites in brain in old versus young rats following portacaval anastomosis

Neurochemistry International (Soumis)

Robert M. Audet¹ and Roger F. Butterworth^{1,2}

¹ Neuroscience Research Unit, CHUM pavillon Saint-Luc (University of Montreal), Montréal, Québec, Canada

² To whom correspondence should be addressed at Neuroscience Research Unit, CHUM pavillon Saint-Luc, 1058 St-Denis Street, Montréal, Québec H2X 3J4 Canada,

ABSTRACT

Hepatic Encephalopathy (HE) is a major neuropsychiatric complication of portacaval anastomosis (PCA) or transjugular intrahepatic portacaval shunt (TIPS) in humans with chronic liver disease. Post-TIPS encephalopathy is particularly prevalent in older patients. As part of a series of studies to elucidate the neurobiological mechanisms responsible for the increased prevalence of encephalopathy in older individuals, the effect of portacaval anastomosis on the uptake sites for glutamate, ionotropic glutamate receptors and amino acid concentrations in brain tissue were evaluated in frontal cortex of 3-month old rats (young adult) and in 25-month old rats (old adult). There was no increase in the binding of [³H]-D-Aspartate, a selective ligand for glutamate uptake sites, in 3-month old rats but a significant ($p < 0.05$) increase was observed in 25-month old rats following PCA. Moreover, PCA in the older group resulted in a significant increase in glutamate transporter protein (GLT-1) in cerebral cortex ($p < 0.01$). However, no changes were noted in the steady state level of GLT-1 mRNA suggesting that a post-transcriptional mechanism is implicated in the increase at the protein level. No significant changes were noted in [³H]-AMPA or [³H]-MK801 binding following PCA in both age groups. There was no significant change in blood ammonia levels between young and old animals following PCA, suggesting a greater vulnerability of CNS function to PCA in older animals to the same levels of ammonia. Reduced neuronal excitability following increased glutamate uptake could explain the higher prevalence of HE in older animals.

INTRODUCTION

Chronic liver disease is often followed by portal hypertension and consequently ascites and esophageal varices, which may result in severe hemorrhage. These complications are now successfully treated by decompressive surgery or intrahepatic portosystemic stent shunt (TIPS). A deplorable consequence of this procedure is the development of new or worsening episodes of hepatic encephalopathy (HE) in up to 40% of cases (Gines, P. *et al.* 1987; Mutchnick, M.G. *et al.* 1974; Rössle, M. *et al.* 1994; Sanyal, A.J. *et al.* 1994). In the chronic form, HE develops slowly starting with personality changes, altered sleep patterns, shortened attention span, muscular incoordination and asterixis, progressing to stupor and coma. The overall risk of post-TIPS encephalopathy is increased in patients with prior history of HE, a large diameter shunt and advanced age (Rössle, M. *et al.* 1994; Shiffman, M.L. *et al.* 1995; Somberg, K.A. *et al.* 1995). Among patients treated with TIPS, those who develop new or worsening episodes of HE are significantly older than those who do not (64 ± 8 versus 54 ± 12 years, $p < 0.05$) (Rössle, M. *et al.* 1994). Multivariate analysis confirmed that age is one of the few independent predicting factors for HE in humans following TIPS (Cabrera, J. *et al.* 1996; García-Villarreal, L. *et al.* 1999).

Although the pathophysiologic mechanisms implicated in HE are incompletely understood, there is a growing body of evidence to suggest alterations of the glutamatergic neurotransmission system induced by the high brain ammonia levels observed in this syndrome (for review, see Chan, H. and Butterworth, R.F. 1999; Hazell, A.S. and Butterworth, R.F. 1999; Norenberg, M.D. 1998). The brain being devoid of a functional urea cycle, in order to detoxify brain ammonia it must rely on the formation of glutamine from glutamate and

ammonia. This reaction is believed to take place almost exclusively in astrocytes where the enzyme glutamine synthetase is uniquely expressed (Martinez-Hernandez, A. *et al.* 1977; Shank, R.P. *et al.* 1993). In normal physiological conditions this is an important component of the glutamate-glutamine cycle that recycles the neurotransmitter glutamate taken up by the astrocyte into glutamine for shuttling back to neurons. Consistent with this exposure of brain to increased concentrations of blood-borne ammonia, CSF and brain glutamine levels are elevated in rats and humans with HE (Giguère, J.F. and Butterworth, R.F. 1984; Lavoie, J. *et al.* 1987).

Not only can chronic exposure to ammonia interfere with glutamate and glutamine metabolism, but recent data show that it can also exert a deleterious effect on other constituents of the glutamatergic system including NMDA receptors (Peterson, C. *et al.* 1990), as well as AMPA and kainate (Maddison, J.E. *et al.* 1991; Maddison, J.E. *et al.* 1992) receptors and glutamate uptake sites (Suárez, I. *et al.* 2000).

In order to further elucidate the mechanisms implicated in the greater prevalence of HE in older individuals, the effect of portacaval anastomosis (PCA) on the uptake sites for glutamate, ionotropic glutamate receptors and amino acid levels were evaluated in cerebral cortex of 3-month old rats (young adult) and in 25-month old rats (old adult).

MATERIALS AND METHODS

Animal surgery

All surgical procedures were conducted (and animals were cared for) in

accordance with the 1984 *Principles of the Guide for the Care and Use of Experimental Animals*, Vol. 2 of the Canadian Council on Animal Care, Ottawa.

Groups of 2 month-old and 24 month-old Sprague-Dawley rats were anesthetized with halothane, and an end-to-side portacaval anastomosis was performed according to the guidelines of Lee and Fisher (Lee, S.H. and Fisher, B. 1961). Briefly, rats underwent a laparotomy, the inferior vena cava and portal vein were isolated, the inferior vena cava was partially clamped (anastomosis clamp; Roboz Instruments) and an elliptical piece of vein, 1.5 times the portal vein diameter, was removed. The portal vein was ligated, cut, and an end-to-side anastomosis was performed using 7-0 silk suture under a dissecting microscope. Total surgery time was less than 15 min. and overall mortality for shunted rats was <2%. Two additional groups of rats (n=7 each of 2 month-old and 24 month-old Sprague-Dawley rats, weight-matched with the above groups) were similarly anesthetized, a laparotomy was performed, and the inferior vena cava and portal vein were clamped for 15 min., these animals served as controls. Following surgery, all animals were kept under constant conditions of temperature, humidity and light cycles and were allowed free access to standard laboratory chow and water. All portacaval shunts were tested by retrograde injection of saline into the inferior vena cava at the time of killing and were found to be patent.

D-[³H]-Aspartate, [³H]-AMPA and [³H]-MK801 autoradiography

Four weeks after surgery, the rats were decapitated, the brains were rapidly removed and frozen in liquid nitrogen. Neck blood was collected into heparinized tubes and centrifuged for ammonia determination using an ion-exchange resin technique (Forman, D.T. 1964). 20 µm brain sections were

then thaw-mounted onto gelatin-coated glass cover slips and kept at -80°C until assay.

For D- ^{3}H -Aspartate autoradiography, slides were pre-incubated at room temperature for 10 min. in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) to remove endogenous amino acids and various ions. Binding was carried out for 10 min. at $0-4^{\circ}\text{C}$ in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 100 nM D- ^{3}H -Aspartate (specific activity 10.9 Ci/mmol, New England Nuclear) and 300 mM NaCl. Non-specific binding was determined in adjacent sections by the addition of 100 μM D,L-threo- β -hydroxyaspartate (Research Biochemical Inc., Natick, MA). The sections were rinsed in four changes of ice-cold Tris-HCl buffer and dipped briefly in cold distilled water for a total time of 30 s.

For ^{3}H -AMPA autoradiography, slides were pre-incubated in 50 mM Tris-Acetate (TA) (pH 7.2) for 30 min. at 4°C . Slides were incubated in a solution containing 50 nM ^{3}H -AMPA (specific activity 53.0 Ci/mmol, New England Nuclear) and 100 mM potassium thiocyanate (KSCN) for 10 min. at 4°C . Nonspecific binding was determined by the addition of 100 μM unlabeled AMPA to the incubation solution. The sections were rinsed in four changes of ice-cold TA buffer and dipped briefly in cold distilled water for a total time of 30 s.

For ^{3}H -MK801 autoradiography, slides were pre-incubated at $0-4^{\circ}\text{C}$ for 30 min. in 50 mM TA (pH 7.4). Sections were then incubated in 50 mM TA buffer (pH 7.4) containing 5 nM ^{3}H -MK801 (specific activity 22.0 Ci/mmol, New England Nuclear), 30 μM glutamate and 10 μM glycine for 120 min. at room temperature. Non-specific binding was determined in adjacent sections by the addition of 5 μM MK-801 (Research Biochemical Inc., Natick, MA) with the same conditions. The sections were rinsed briefly and left to soak for

90 min. in ice-cold buffer, then dipped briefly in cold distilled water.

After rinsing, the sections were dried rapidly under a cool air stream. Dried sections were exposed to Hyperfilm™ for 4 weeks at 4°C along with methyl-methacrylate radioactive standards (Amersham microscapes). Regions of interest were localized with the help of adjacent sections stained with cresyl violet (Nissl stain) in accordance with an established rat brain atlas (Paxinos, G. and Watson, C. 1982). Autoradiograms were analyzed on an imaging system (MCID, St-Catharines, Ont.).

Immunoblot analysis

Cortical tissues were homogenized 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., 50 µg of protein extracts were boiled for 5 min. in loading buffer (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10 % glycerol, 2% SDS, 0.1 M dithiothreitol, 0.1% bromophenol blue). Proteins were resolved by 8% denaturing SDS-polyacrylamide gels along with rainbow molecular mass markers and transferred overnight to nitrocellulose filters. The membranes were blocked for 2 h at room temperature in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST) containing 5% nonfat dry milk. The membrane was then incubated for 1 h with anti-GLT-1 (1/4000).. The blots were subsequently probed with anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated antiserum (1/25 000) in the same buffer. After extensive washing with TBST, the peroxidase activity was detected by chemiluminescence using the ECL detection system (Amersham, Arlington Heights, IL).

The density of immunoreactive bands was quantified with an imaging system (MCID, St-Catharines, Ont.) and expressed as relative optical density (ROD).

Glutamate transporter gene expression (RT-PCR)

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 hr. Purified RNA was then extracted with phenol, precipitated with ethanol and resuspended in diethylpyrocarbonate-treated water. RNA samples were kept at -70°C until use.

Expression of the glutamate transporter (GLT-1) was investigated by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). β-Actin was used as an internal standard to monitor loading variations. Total RNA (1 µg) was mixed with 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.01%(w/v) bovine serum albumin, 100 µM dNTPs, primers at 1 µM each, AMV reverse transcriptase (80 U/ml), Taq DNA polymerase (20 U/ml) and 50 µCi/ml [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mM), for a total reaction volume of 50 µl. The reactions were initially heated at 50°C for 15 min followed by PCR at 95°C for 30 sec, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min. Amplification efficiency conditions were determined after a kinetic study, to ensure all experiments were performed within the exponential phase of amplification where PCR product remains proportional to the initial template concentration (data not shown). β-Actin and GLT-1 were amplified for 18 cycles and 19 cycles, respectively. After amplification, the samples were electrophoresed onto 8% polyacrylamide gels, dried, and autoradiographed at -70°C with an intensifying screen. Each band was excised and Cerenkov radiation was quantitated using a β-counter.

Oligonucleotide primers (Sheldon Biotechnology Center, McGill University, Quebec) were designed using the PRIME program (Genetic Computer Group, Wisconsin) based on the following GeneBank accession numbers: β -actin: V01217 (Nudel, U. *et al.* 1983) and GLT-1: X67857 (Storck, T. *et al.* 1992). The forward and reverse primer sequences were as follows: CATCCCCAAAGTTCTAC and CCAAAGCCTTCATACATC (β -actin, 347bp); TACAGCCCTTTACGAAGCC and TGATAGACAATCCCAGCCC (GLT-1, 285bp). The monospecificity of oligonucleotide primers was verified using the program BLASTN (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD).

Measurement of tissue amino acids

Frozen tissue was sonicated in 400 μ l potassium phosphate buffer (50 mM pH 7.4) as previously described (Lavoie, J. *et al.* 1987) and 10 μ l of this solution was kept for protein determination. 100 μ l of perchloric acid 50% (v/v) was added to the remaining solution, vortexed immediately and centrifuged at 28 000 g for 10 min. Then, 1 ml of cold water-saturated diethylether (DEE) was added to the supernatant and vortexed. Once the two phases were re-separated, the supernatant DEE was discarded and this washing procedure was repeated once. This solution was diluted 1/275, 1 μ l was mixed with 1 μ l of norvaline 0.3 mM as internal standard and then reacted at room temperature with OPA reagent in a total volume of 28 μ l. Exactly 60 sec later, the reaction was stopped by addition of 20 μ l HCl (0.5 M). 20 μ l of this solution was injected onto the column (C₁₈ Pecosphere, Perkin Elmer) exactly 2 min. after the start of the derivatization. Peak area measurements were computed using a programmable recording integrator (Perkin Elmer LC-100). The chromatograph was run with a linear gradient

between methanol and sodium phosphate buffer (50 mM, pH 5.25, containing THF 2%, as previously described (Lavoie, J. *et al.* 1987)). The gradient was run from 25 % to 50 % methanol over 35 min., then 50% methanol over 20 min. The column was subsequently washed with 25% methanol/75% buffer for 5 min. and reequilibrated with 25% methanol/75% buffer for an additional 3 min. before reuse. Amino acid content was calculated by peak area analysis using standard curves and the internal standard.

Statistical analysis

Specific binding of D-[³H]-Aspartate, [³H]-AMPA and [³H]-MK801 were compared for the two variables (age and portacaval shunting) using a two-way analysis of variance (ANOVA), followed by a post hoc Tukey test. A two-way ANOVA was also used for each amino acid determined by HPLC and for physiological parameters followed by a post hoc Tukey test. For GLT-1 Western and RT-PCR analysis, a student t-test between old PCA and old control was performed.

RESULTS

Effect of portacaval anastomosis on liver weight

Both PCA groups showed significant liver atrophy, a 64% and a 57% decrease in liver weight was observed in the 25 month-old and the 3 month-old PCA rats respectively, when compared to their appropriate control group. PCA induced a significant rise in blood ammonia of the same magnitude in young and old rats (171% and 156% respectively vs. their appropriate controls), although the

levels of young PCA and old PCA rats were not significantly different (380 ± 40 and 410 ± 40 $\mu\text{g}/\text{dl}$ respectively). These values showed good agreement with those previously reported in young portacaval-shunted rats (Girard, G. *et al.* 1993).

D-[^3H]-Aspartate autoradiography

It appears that aging *per se* has no effects on glutamate uptake sites, considering that no age-related alterations of D-[^3H]-Aspartate binding sites were observed in young versus old controls (Figure 2.7).

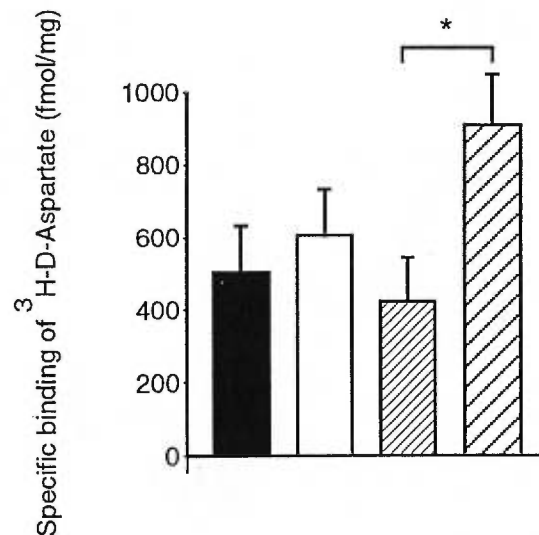


Figure 2.7 Specific binding of D-[^3H]-aspartate (fmol/mg tissue) in frontal cortex of young control (filled bar), young following portacaval anastomosis (empty bar), old control (finely hatched bar) and old following portacaval anastomosis (coarsely hatched bar).

PCA led to a significant increase in D-[³H]-Aspartate binding sites in the old group in frontal cortex but failed to induce any change in the young group (Figure 2.7). The magnitude of this PCA-induced increase in the old animals was 116% in the frontal cortex.

Immunoblot analysis

Old PCA animals manifested a significant increase ($p < 0.01$) in GLT-1 protein compared to the old control group (455.3 ± 51.5 and 221.5 ± 48.7 (ROD) respectively) in cerebral cortex (Figure 2.8). This increase in GLT-1 protein expression is of the same magnitude as the increase in D-[³H]-Aspartate binding sites observed in this region (105% and 116%, respectively)

Polymerase chain reaction

No significant differences were noted between old PCA and control rats (2.50 ± 0.16 and 2.95 ± 0.19 (GLT-1/ β -actin \pm S.E.M.) respectively) in the levels of mRNA for the GLT-1/EAAT2 subtype of glutamate transporter in cerebral cortex as measured by RT-PCR (Figure 2.9).

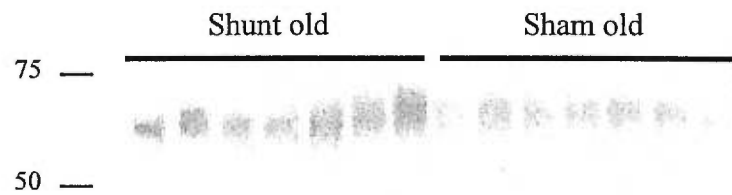


Figure 2.8 Western blot analysis of glutamate transporter (GLT-1) expression in cerebral cortex of old adult rats four weeks following portacaval anastomosis (455.3 ± 51.5 R.O.D.) or sham operation. (221.5 ± 48.7 R.O.D.). Each lane was loaded with $50\mu\text{g}$ of protein and resolved on a 8% denaturing SDS-polyacrylamide gel and transferred overnight to nitrocellulose filters. The membranes were blocked for 2h with Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 containing 5% nonfat dry milk and incubated with anti GLT-1 (1/4000) then with anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated antiserum (1/25 000) and visualized using enhanced chemiluminescence.

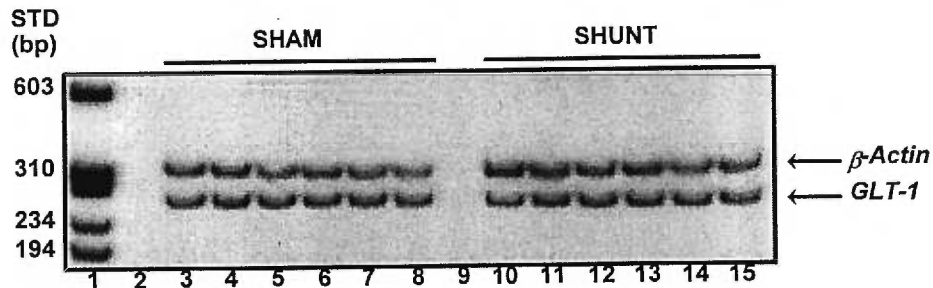


Figure 2.9 Expression of the astrocytic glutamate transporter (GLT-1) mRNA in the brain of rats following portacaval anastomosis. Total RNA was extracted from the frontal cortex of rats with portacaval anastomosis (lanes 10-15) or from sham operated controls (lanes 3-8). β -Actin (347bp) and GLT-1 (285bp) were reverse-transcribed and amplified by PCR for 18 and 19 cycles, respectively. Lane 1: molecular weight standards (bp); lanes 2 and 9: AMV reverse transcriptase was omitted (as a negative control) from the reaction mixture.

[³H]-AMPA and [³H]-MK-801 autoradiography

A significant age-related decrease in [³H]-MK-801 was noted between control groups, as well as between PCA groups (Figure 2.10). This is in accordance with numerous studies describing decreased NMDA receptors with aging

(Magnusson, K.R. and Cotman, C.W. 1993a; Magnusson, K.R. and Cotman, C.W. 1993b; Mitchell, J.J. and Anderson, K.J. 1998; Tamaru, M. *et al.* 1991). On the other hand, no significant change in cortical [^3H]-AMPA or [^3H]-MK801 binding was noted between control and PCA rats of either age group (Figure 2.10 and 2.11).

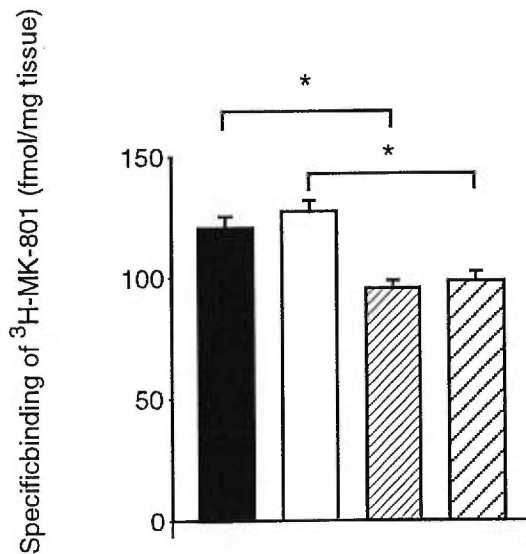


Figure 2.10 Specific binding of [^3H]-MK801 (fmol/mg tissue) in frontal cortex of young control (filled bar), young following portacaval anastomosis (empty bar), old control (finely hatched bar) and old following portacaval anastomosis (coarsely hatched bar).

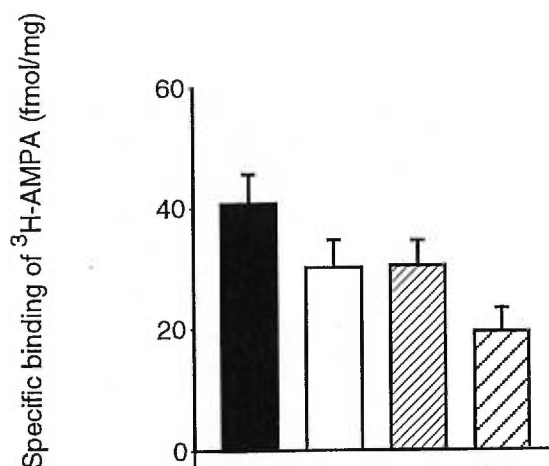


Figure 2.11 Specific binding of [³H]-AMPA (fmol/mg tissue) in frontal cortex of young control (filled bar), young following portacaval anastomosis (empty bar), old control (finely hatched bar) and old following portacaval anastomosis (coarsely hatched bar).

Cortical tissue amino acid concentrations

A three fold increase in glutamine was noted in cortical homogenates of young PCA, whereas a four fold increase was noted in old PCA rats when compared to their appropriate controls (Table 2.5). These values are in good agreement with those previously reported in young PCA rats (Giguère, J.F. and Butterworth, R.F. 1984; Williams, A.H. *et al.* 1972; Zanchin, G. *et al.* 1979). A small but significant increase (66%) in glutamate was detected in cortical homogenates of old PCA rats, increases in young PCA rats were significantly lower compared to old animals (Table 2.5).

Table 2.5 Concentrations of amino acids in cortical tissue of 3 month and 25 month-old rats four weeks after PCA (shunt) or sham operation.

Amino-acid	Young			Old		
	Sham	Shunt	% change	Sham	Shunt	% change
Alanine	15.8 ± 3.4	18.3 ± 2.9	15	25.4 ± 3.2	22.8 ± 3.5	-10
Arginine	20.6 ± 2.6	15.1 ± 3.1	-26	24.0 ± 2.5	24.3 ± 2.7	1
Asparagine	11.9 ± 1.5	13.2 ± 1.8	12	15.9 ± 1.9	19.1 ± 1.7	21
Aspartate	13.7 ± 1.0	11.9 ± 1.2	-13	16.0 ± 1.1	15.1 ± 1.3	-6
GABA	9.9 ± 1.1	7.9 ± 1.1	-20	10.5 ± 1.7	11.2 ± 1.4	7
Glutamate	306.2 ± 17.8	373.1 ± 18.3*	21	260.0 ± 18.3	432.7 ± 18.3**	66
Glutamine	12.8 ± 10.1	43.1 ± 11.2*	237	25.7 ± 12.3	110.0 ± 13.4**	328
Glycine	31.9 ± 8.6	39.3 ± 9.1	23	54.1 ± 8.4	68.1 ± 8.5	26
Phenylalanine	35.4 ± 24.3	53.8 ± 25.9	52	83.1 ± 24.1	85.9 ± 26.8	3
Serine	32.9 ± 4.2	32.8 ± 5.3	0	42.8 ± 3.4	41.3 ± 2.2	-4
Taurine	124.9 ± 9.1	99.5 ± 10.2	-20	127.1 ± 8.7	107.8 ± 9.9	-15
Threonine	18.7 ± 1.2	15.3 ± 2.1	-18	19.8 ± 1.1	18.1 ± 1.5	-9
Tyrosine	4.7 ± 1.2	5.0 ± 0.9	8	7.9 ± 1.9	9.5 ± 1.1	20
Valine	3.8 ± 0.7	3.3 ± 0.9	-12	4.8 ± 0.6	4.6 ± 0.8	-3

Values are nmol/mg protein ± S.E.M. from 7 animals per treatment group. Significant differences between portacaval shunted and sham-operated controls values within the same age group are indicated by * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$, by analysis of variance with Tukey post hoc test.

DISCUSSION

The present study shows that PCA in old animals leads to a significant increase in D-[³H]-Aspartate binding to central glutamate transporter sites, with a concomitant increase in the expression of the GLT1/EAAT2 subtype of glutamate transporter. However, no such change was observable in their

younger counterparts or between controls of either age group, suggesting that older individuals might be more vulnerable to the effects of PCA. Increases in GLT-1/EAAT2 transporter density were not accompanied by changes in the steady state level of mRNA suggesting that post-transcriptional mechanisms are responsible for the elevated transporter protein level observed in the old animals following PCA. Glutamate and glutamine levels in cortical tissue were significantly increased following PCA in both age groups, although no changes in cortical [^3H]-AMPA or [^3H]-MK801 receptor autoradiography were noted. This lack of effect on the plasma membrane receptors suggests that the glutamate increase is intracellular. The higher glutamate and glutamine concentrations in the old animals following PCA, as well as their increased transporter expression could lead to increased vulnerability of older individuals to the deleterious effects of shunting.

Termination of glutamatergic transmission occurs via uptake of glutamate by a family of high-affinity glutamate transporters with, at present, five cloned members (GLAST/EAAT1, GLT1/EAAT2, EAAC1/EAAT3, EAAT4 and EAAT5) (Gegelashvili, G. and Schousboe, A. 1997). Previous reports on the effect of either acute or chronic ammonia exposure on glutamate uptake function have yielded conflicting results.

The lack of change in glutamate uptake sites reported here in young PCA animals is in agreement with a report of unchanged glutamate uptake in brain slices and cortical synaptosomes of rats chronically exposed to high ammonia levels after portal-vein and bile duct-ligation (Maddison, J.E. *et al.* 1996). One month after PCA, GLT-1/EAAT2 immunolabeling was higher in the granular layer of cerebellum, whereas there was a decrease in GLAST/EAAT1 in the molecular layer (Suárez, I. *et al.* 2000). The later study was done using

immunohistochemistry and qualitative evaluation that cannot be directly compared to the binding and expression data we are reporting here.

A different trend is observed in acute liver failure or acute exposure to ammonia *in vivo*, as well as *in vitro*. Acute exposure of synaptosomes to ammonia results either in reduced V_{max} for glutamate uptake (Oppong, K.N. *et al.* 1995) or reduced K⁺ stimulated glutamate uptake (Mena, E.E. and Cotman, C.W. 1985). In astrocytic cultures acutely exposed to ammonia, there is a decrease in the expression of GLAST/EAAT1 (Zhou, B.G. and Norenberg, M.D. 1999) and GLT-1/EAAT2 (Norenberg, M.D. *et al.* 1997). Likewise, a decrease in GLT-1/EAAT2 mRNA and protein levels were observed in rats with acute liver failure (Knecht, K. *et al.* 1997). Similarly, exposure to sera or CSF coming from patients in HE resulted in a decreased glutamate uptake in hippocampal slices of normal rats (Schmidt, W. *et al.* 1993; 1990) or hippocampal slices of patients who died in hepatic coma (Schmidt, W. *et al.* 1990). These results emphasize the difference between chronic versus acute exposure to ammonia of glutamate transporters, and may represent an adaptation of the brain to sustained high levels of ammonia and/or glutamate.

This increase in glutamate uptake could be a response to the increased glutamate release in chronic HE (Butterworth, R.F. *et al.* 1991; Moroni, F. *et al.* 1983; Tossman, U. *et al.* 1987), as well as the increase in CSF glutamate in HE patients (Van Sande, M. *et al.* 1970; Vergara, F. *et al.* 1974; Watanabe, A. *et al.* 1984) or in PCA rats (Therrien, G. and Butterworth, R.F. 1991). Our results showing a PCA-dependent increase in glutamate in cortical tissue do not necessarily reflect a change at the extracellular level but might represent an intracellular pool not affecting plasma membrane receptors. The glutamate transport system seems to have a very limited capacity of adaptation in HE.

This is evidenced by the significant increase in extracellular (Tossmann, U. *et al.* 1987) or CSF (Therrien, G. and Butterworth, R.F. 1991; Van Sande, M. *et al.* 1970; Vergara, F. *et al.* 1974; Watanabe, A. *et al.* 1984) glutamate produced either by an ammonia load or K⁺ induced depolarization.

Theoretically, a rise in glutamate release could be a consequence of energy failure in the astrocyte, inducing a reversal of glutamate transport because of the collapse of the ionic gradient (Gemba, T. *et al.* 1994). However, this seems improbable since in our model we observe an increase of local cerebral glucose utilization (LCGU) in thalamus (Audet, R.M. and Butterworth, R.F. 1998) as well as an increase in D-[³H]-Aspartate binding sites (data not shown). Conversely, increased glutamate uptake could produce an added energy demand. We see the contrary in the old animals following PCA, our data showing a decrease in LCGU (Audet, R.M. and Butterworth, R.F. 1998) in frontal and fronto-parietal cortices. This could be explained by the fact that astrocytic cultures increase their use of glutamate as energy substrate for the TCA cycle when extracellular concentrations of glutamate rise (McKenna, M.C. *et al.* 1996; Swanson, R.A. *et al.* 1990). This effect is not the consequence of glutamate receptor activation as it is inhibited by glutamate uptake blockers but not glutamate receptor antagonists (Swanson, R.A. *et al.* 1990).

Several conflicting reports on glutamate uptake sites in aging have been published. An age-induced decrease in glutamate uptake sites was described in rat cortical slices (Matsumoto, H. *et al.* 1982), as well as in mitochondria (Vitorica, J. *et al.* 1985) or synaptosomes (Najlerahim, A. *et al.* 1990; Price, M.T. *et al.* 1981; Wheeler, D.D. and Ondo, J.G. 1986). On the other hand, unchanged glutamate uptake in synaptosomes of aged animals was also noted (Gilad, G.M. *et al.* 1990; Palmer, A.M. *et al.* 1994). The fact that no age-

induced changes in D-aspartate binding was observed in our model argues in favor of a normal glutamate transport function with aging but alterations of the capacity for adaptation could appear with age. Our data suggests that the aging brain needs more glutamate transporters than a younger one to cope with a similar increase in plasmatic ammonia levels. This could be explained by the fact that oxidative stress, a well known aging phenomenon, inhibits glutamate transporters (Piani, D. *et al.* 1993; Trotti, D. *et al.* 1996; Volterra, A. *et al.* 1994).

Astrocytic counts performed in this animal model (Audet, R.M. and Butterworth, R.F. 2000) show that the increase in D-[³H]-Aspartate binding sites and in GLT-1 expression observed in the 25-month old PCA rats are not due to increased numbers of astrocytes.

There seems to be a contradiction between the elevated glutamate and glutamine concentration we observe in old rats following PCA and the lack of increase in plasma ammonia levels. One possibility is an increase in the blood brain barrier permeability to ammonia or a change in brain or intracellular pH, since brain ammonia has been shown to increase with increasing pH (Cooper, A.J. and Plum, F. 1987). On the other hand, an alteration in glutamine synthetase activity or expression, or a change in the metabolism and/or export of glutamine could increase brain glutamine concentrations. An increase in glutamine accumulation was observed in brain slices from old rats exposed to increasing concentrations of ammonia, when compared to young animals (Wallace, D.R. and Dawson, R.J. 1992). Incidentally, it was also shown that brain ammonia is slightly elevated and that glutamine is the only amino acid increased in the brains of normal senescent mice (Kirzinger, S.S. and Fonda, M.L. 1978). This could add to the ammonia load from the periphery and

explain the greater increase in glutamine concentrations in the cortex of old rats following PCA.

The significant decrease in ^3H -MK801 binding we observe here with increasing age in the control groups is in accordance with several reports on normal aging (Magnusson, K.R. and Cotman, C.W. 1993a; Magnusson, K.R. and Cotman, C.W. 1993b; Tamaru, M. *et al.* 1991). The absence of effect of PCA on the neuronal ^3H -MK801 binding in either age groups suggests that synaptic levels of glutamate are not significantly altered with PCA. In young animals with a PCA, a decrease (Peterson, C. *et al.* 1990) or unchanged (Maddison, J.E. *et al.* 1991) cortical NMDA receptor density were reported. Since astrocytes express AMPA receptors (Gallo, V. and Russell, J.T. 1995) and the vast majority of glutamate transporters (Rothstein, J.D. *et al.* 1996), the small but non significant decrease in ^3H -AMPA binding along with the significant increase in ^3H -D-aspartate noted following PCA in the aged group could reflect a greater astrocytic response to PCA.

In summary, results of the present study reveal a cortical increase in [^3H]-D-aspartate binding as well as in the GLT-1 subtype of glutamate transporter protein following PCA, but only in the aged animals. This increase of GLT-1 at the protein level was not accompanied by an increase in mRNA, suggesting a change in post-transcriptional mechanisms. Increases in cortical tissue concentrations of glutamate and glutamine were noted in both age groups following PCA, although no PCA-dependent changes in [^3H]-AMPA or [^3H]-MK801 were observed. These age-related changes following PCA were not the result of greater increases of blood ammonia in these animals. However, there is indirect evidence of higher brain ammonia levels in aged rats following PCA, that could produce a neurotransmitter imbalance in these

animals. The greater susceptibility of the aging brain to the deleterious effects of PCA is consistent with the higher incidence of encephalopathy in older patients following TIPS.

ACKNOWLEDGMENTS

Studies in the author's research unit were funded by The Medical Research Council of Canada. RMA was the recipient of a studentship from the Canadian Liver Foundation.

REFERENCES

- Audet, R.M. and Butterworth, R.F. (1998). Portacaval anastomosis results in more widespread alterations of cerebral metabolism in old versus young adult rats: implications for post-shunt encephalopathy. *Metabolic Brain Disease* **13** (1): 69-78.
- Audet, R.M. and Butterworth, R.F. (2000). Alteration of astrocyte morphology and of "peripheral type" benzodiazepine receptor sites in brain following portacaval anastomosis: effect of aging. *Metabolic Brain Disease* (submitted)
- Butterworth, R.F., Le, O., Lavoie, J. and Szerb, J.C. (1991). Effect of portacaval anastomosis on electrically stimulated release of glutamate from rat hippocampal slices. *Journal of Neurochemistry* **56** (5): 1481-4.
- Cabrera, J., Maynar, M., Granados, R., Gorriz, E., Reyes, R., Pulido-Duque, J.M., Rodriguez SanRoman, J.L., Guerra, C., *et al.* (1996). Transjugular intrahepatic portosystemic shunt versus sclerotherapy in the elective treatment of variceal hemorrhage. *Gastroenterology* **110** (3): 832-9.
- Chan, H. and Butterworth, R.F. (1999). Evidence for an astrocytic glutamate transporter deficit in hepatic encephalopathy. *Neurochemical Research* **24** (11): 1397-401.

- Cooper, A.J. and Plum, F. (1987). Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiological Reviews* **67** (2): 440-519.
- Forman, D.T. (1964). Rapid determination of plasma ammonia by an ion-exchange technique. *Clinical Chemistry* **10** (6): 497-508.
- Gallo, V. and Russell, J.T. (1995). Excitatory amino acid receptors in glia: different subtypes for distinct functions? *Journal of Neuroscience Research* **42** (1): 1-8.
- García-Villarreal, L., Martínez-Lagares, F., Sierra, A., Guevara, C., Marrero, J.M., Jiménez, E., Monescillo, A., Hernández-Cabrero, T., *et al.* (1999). Transjugular intrahepatic portosystemic shunt versus endoscopic sclerotherapy for the prevention of variceal rebleeding after recent variceal hemorrhage. *Hepatology* **29** (1): 27-32.
- Gegelashvili, G. and Schousboe, A. (1997). High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Molecular Pharmacology* **52** (1): 6-15.
- Gemba, T., Oshima, T. and Ninomiya, M. (1994). Glutamate efflux via the reversal of the sodium-dependent glutamate transporter caused by glycolytic inhibition in rat cultured astrocytes. *Neuroscience* **63** (3): 789-95.
- Giguère, J.F. and Butterworth, R.F. (1984). Amino acid changes in regions of the CNS in relation to function in experimental portal-systemic encephalopathy. *Neurochemical Research* **9** (9): 1309-21.
- Gilad, G.M., Gilad, V.H. and Tizabi, Y. (1990). Aging and stress-induced changes in choline and glutamate uptake in hippocampus and septum of two rat strains differing in longevity and reactivity to stressors. *International Journal of Developmental Neuroscience* **8** (6): 709-13.
- Gines, P., Quintero, E., Arroyo, V., Teres, J., Bruguera, M., Rimola, A. and Caballeria, J. (1987). Compensated cirrhosis: natural history and prognostic factors. *Hepatology* **7** 122-128.

- Girard, G., Giguère, J.F. and Butterworth, R.F. (1993). Region-selective reductions in activities of glutamine synthetase in rat brain following portacaval anastomosis. *Metabolic Brain Disease* **8** (4): 207-15.
- Hazell, A.S. and Butterworth, R.F. (1999). Hepatic encephalopathy: An update of pathophysiologic mechanisms. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine* **222** (2): 99-112.
- Kirzinger, S.S. and Fonda, M.L. (1978). Glutamine and ammonia metabolism in the brains of senescent mice. *Experimental Gerontology* **13** (3-4): 255-61.
- Knecht, K., Michalak, A., Rose, C., Rothstein, J.D. and Butterworth, R.F. (1997). Decreased glutamate transporter (GLT-1) expression in frontal cortex of rats with acute liver failure. *Neuroscience Letters* **229** (3): 201-3.
- Lavoie, J., Giguère, J.F., Layrargues, G.P. and Butterworth, R.F. (1987). Amino acid changes in autopsied brain tissue from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Journal of Neurochemistry* **49** (3): 692-7.
- Lee, S.H. and Fisher, B. (1961). Portocaval shunt in the rat. *Surgery* **50** 668-72.
- Maddison, J.E., Mickelthwaite, C., Watson, W.E. and Johnston, G.A. (1996). Synaptosomal and brain slice cerebrocortical [³H]L-glutamate uptake in a rat model of chronic hepatic encephalopathy. *Neurochemistry International* **28** (1): 89-93.
- Maddison, J.E., Watson, W.E., Dodd, P.R. and Johnston, G.A. (1991). Alterations in cortical [³H]kainate and alpha-[³H]amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid binding in a spontaneous canine model of chronic hepatic encephalopathy. *Journal of Neurochemistry* **56** (6): 1881-8.
- Maddison, J.E., Watson, W.E. and Johnston, G.A. (1992). CNQX binding to non-NMDA glutamate receptors in canine cerebro-cortical crude synaptosomal membranes: pharmacological characterization and comparison of binding parameters in dogs with congenital portosystemic encephalopathy and control dogs. *Metabolic Brain Disease* **7** (1): 35-44.

- Magnusson, K.R. and Cotman, C.W. (1993a). Age-related changes in excitatory amino acid receptors in two mouse strains. *Neurobiology of Aging* **14** (3): 197-206.
- Magnusson, K.R. and Cotman, C.W. (1993b). Effects of aging on NMDA and MK801 binding sites in mice. *Brain Research* **604** (1-2): 334-7.
- Martinez-Hernandez, A., Bell, K.P. and Norenberg, M.D. (1977). Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* **195** (4284): 1356-8.
- Matsumoto, H., Kikuchi, S. and Ito, M. (1982). Age-related changes in the glutamate metabolism of cerebral cortical slices from rats. *Neurochemical Research* **7** (6): 679-85.
- McKenna, M.C., Sonnewald, U., Huang, X., Stevenson, J. and Zielke, H.R. (1996). Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *Journal of Neurochemistry* **66** (1): 386-93.
- Mena, E.E. and Cotman, C.W. (1985). Pathologic concentrations of ammonium ions block L-glutamate uptake. *Experimental Neurology* **89** (1): 259-63.
- Mitchell, J.J. and Anderson, K.J. (1998). Age-related changes in [³H]MK-801 binding in the Fischer 344 rat brain. *Neurobiology of Aging* **19** (3): 259-65.
- Moroni, F., Lombardi, G., Moneti, G. and Cortesini, C. (1983). The release and neosynthesis of glutamic acid are increased in experimental models of hepatic encephalopathy. *Journal of Neurochemistry* **40** (3): 850-4.
- Mutchnick, M.G., Lerner, E. and Conn, H.O. (1974). Porto-systemic encephalopathy and portacaval anastomosis: a prospective controlled investigation. *Gastroenterology* **66** 1005-19.
- Najlerahim, A., Francis, P.T. and Bowen, D.M. (1990). Age-related alteration in excitatory amino acid neurotransmission in rat brain. *Neurobiology of Aging* **11** (2): 155-8.
- Norenberg, M.D. (1998). Astroglial dysfunction in hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease* **13** (4): 319-35.

- Norenberg, M.D., Huo, Z., Neary, J.T. and Roig, C.A. (1997). The glial glutamate transporter in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: relation to energy metabolism and glutamatergic neurotransmission. *Glia* **21** (1): 124-33.
- Nudel, U., Zakut, R., Shani, M., Neuman, S., Levy, Z. and Yaffe, D. (1983). The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic beta-actin gene. *Nucleic Acids Research* **11** (6): 1759-71.
- Oppong, K.N., Bartlett, K., Record, C.O. and al, M.H. (1995). Synaptosomal glutamate transport in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. *Hepatology* **22** (2): 553-8.
- Palmer, A.M., Robichaud, P.J. and Reiter, C.T. (1994). The release and uptake of excitatory amino acids in rat brain: effect of aging and oxidative stress. *Neurobiology of Aging* **15** (1): 103-11.
- Paxinos, G. and Watson, C. (1982). The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney, Academic Press Australia.
- Peterson, C., Giguère, J.F., Cotman, C.W. and Butterworth, R.F. (1990). Selective loss of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[³H]glutamate binding sites in rat brain following portacaval anastomosis. *Journal of Neurochemistry* **55** (2): 386-90.
- Piani, D., Frei, K., Pfister, H.W. and Fontana, A. (1993). Glutamate uptake by astrocytes is inhibited by reactive oxygen intermediates but not by other macrophage-derived molecules including cytokines, leukotrienes or platelet-activating factor. *Journal of Neuroimmunology* **48** (1): 99-104.
- Price, M.T., Olney, J.W. and Haft, R. (1981). Age-related changes in glutamate concentration and synaptosomal glutamate uptake in adult rat striatum. *Life Sciences* **28** (12): 1365-70.
- Rössle, M., Haag, K., Ochs, A., Sellinger, M., Noldge, G., Perarnau, J.M., Berger, E., Blum, U., *et al.* (1994). The transjugular intrahepatic portosystemic stent-shunt procedure for variceal bleeding. *New England Journal of Medicine* **330** (3): 165-71.

- Rothstein, J.D., Dykes Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., *et al.* (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* **16** (3): 675-86.
- Sanyal, A.J., Freedman, A.M., Shiffman, M.L., Purdum, P.3., Luketic, V.A. and Cheatham, A.K. (1994). Portosystemic encephalopathy after transjugular intrahepatic portosystemic shunt: results of a prospective controlled study. *Hepatology* **20** 46-55.
- Schmidt, W., Wolf, G., Grüngreiff, K. and Linke, K. (1993). Adenosine influences the high-affinity uptake of transmitter glutamate and aspartate under conditions of hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease* **8** (2): 73-80.
- Schmidt, W., Wolf, G., Grungreiff, K., Meier, M. and Reum, T. (1990). Hepatic encephalopathy influences high-affinity uptake of transmitter glutamate and aspartate into the hippocampal formation. *Metabolic Brain Disease* **5** (1): 19-31.
- Shank, R.P., Leo, G.C. and Zielke, H.R. (1993). Cerebral metabolic compartmentation as revealed by nuclear magnetic resonance analysis of D-[1-13C]glucose metabolism. *Journal of Neurochemistry* **61** (1): 315-23.
- Shiffman, M.L., Jeffers, L., Hoofnagle, J.H. and Sue Tralka, T. (1995). The role of transjugular intrahepatic portosystemic shunt for treatment of portal hypertension and its complications: A conference sponsored by the National Digestive Diseases Advisory Board. *Hepatology* **22** (5): 1591-97.
- Somberg, K.A., Riegler, J.L., LaBerge, J.M., Doherty-Simor, M.M., Bachetti, P., Roberts, J.P. and Lake, J.R. (1995). Hepatic encephalopathy after transjugular intrahepatic portosystemic shunts: incidence and risk factors. *American Journal of Gastroenterology* **90** (4): 549-55.
- Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K. and Stoffel, W. (1992). Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89** (22): 10955-9.

Suárez, I., Bodega, G. and Fernández, B. (2000). Modulation of glutamate transporters (GLAST, GLT-1 and EAAC1) in the rat cerebellum following portocaval anastomosis. *Brain Research* **859** (2): 293-302.

Swanson, R.A., Yu, A.C., Chan, P.H. and Sharp, F.R. (1990). Glutamate increases glycogen content and reduces glucose utilization in primary astrocyte culture. *Journal of Neurochemistry* **54** (2): 490-6.

Tamaru, M., Yoneda, Y., Ogita, K., Shimizu, J. and Nagata, Y. (1991). Age-related decreases of the N-methyl-D-aspartate receptor complex in the rat cerebral cortex and hippocampus. *Brain Research* **542** (1): 83-90.

Therrien, G. and Butterworth, R.F. (1991). Cerebrospinal fluid amino acids in relation to neurological status in experimental portal-systemic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease* **6** (2): 65-74.

Tossman, U., Delin, A., Eriksson, L.S. and Ungerstedt, U. (1987). Brain cortical amino acids measured by intracerebral dialysis in portacaval shunted rats. *Neurochemical Research* **12** (3): 265-9.

Trotti, D., Rossi, D., Gjesdal, O., Levy, L.M., Racagni, G., Danbolt, N.C. and Volterra, A. (1996). Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. *Journal of Biological Chemistry* **271** (11): 5976-9.

Van Sande, M., Mardens, Y., Adraenssens, K. and Lowenthal, A. (1970). The free amino acids in human cerebrospinal fluid. *Journal of Neurochemistry* **17** 125-135.

Vergara, F., Plum, F. and Duffy, T.E. (1974). Alpha-ketoglutarate: increased concentrations in the cerebrospinal fluid of patients in hepatic coma. *Science* **183** (120): 81-3.

Vitorica, J., Clark, A., Machado, A. and Satrustegui, J. (1985). Impairment of glutamate uptake and absence of alterations in the energy-transducing ability of old rat brain mitochondria. *Mechanisms of Ageing & Development* **29** (3): 255-66.

Volterra, A., Trotti, D., Tromba, C., Floridi, S. and Racagni, G. (1994). Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *Journal of Neuroscience*

Wallace, D.R. and Dawson, R.J. (1992). Ammonia regulation of phosphate-activated glutaminase displays regional variation and impairment in the brain of aged rats. *Neurochemical Research* **17** (11): 1113-22.

Watanabe, A., Takei, N., Higashi, T., Shiota, T., Nakatsukasa, H., Fujiwara, M., Sakata, T. and Nagashima, H. (1984). Glutamic acid and glutamine levels in serum and cerebrospinal fluid in hepatic encephalopathy. *Biochemical Medicine* **32** (2): 225-31.

Wheeler, D.D. and Ondo, J.G. (1986). Time course of the aging of the high affinity L-glutamate transporter in rat cortical synaptosomes. *Experimental Gerontology* **21** (3): 159-68.

Williams, A.H., Kyu, M.H., Fenton, J.C. and Cavanagh, J.B. (1972). The glutamate and glutamine content of rat brain after portocaval anastomosis. *Journal of Neurochemistry* **19** (4): 1073-7.

Zanchin, G., Rigotti, P., Dussini, N., Vassanelli, P. and Battistin, L. (1979). Cerebral amino acid levels and uptake in rats after portocaval anastomosis: II. Regional studies in vivo. *Journal of Neuroscience Research* **4** (4): 301-10.

Zhou, B.G. and Norenberg, M.D. (1999). Ammonia downregulates GLAST mRNA glutamate transporter in rat astrocyte cultures. *Neuroscience Letters* **276** (3): 145-8.

CHAPITRE 3: DISCUSSION GÉNÉRALE

3.1 ASTROCYTOSE ALZHEIMER DE TYPE II

Nos données montrent qu'il y a apparition d'une astrocytose Alzheimer de type II chez les rats âgés ayant subi une APC (Figure 2.3). Ce changement histologique survient lorsque les astrocytes sont exposés à des concentrations élevées d'ammoniaque. On l'observe *in vivo* chez l'animal ayant une APC suivie d'une surcharge d'ammoniaque (Norenberg, M.D. 1977; Norenberg, M.D. et Lapham, L.W. 1974; Pilbeam, C.M. *et al.* 1983) ou chez l'humain hyperammonémique avec (Martin, H. *et al.* 1987) ou sans (Boogerd, W. *et al.* 1990; Taylor, P. *et al.* 1979) une atteinte hépatique. On voit également des changements similaires *in vitro* par l'exposition d'astrocytes en culture à des concentrations élevées d'ammoniaque (Gregorios, J.B. *et al.* 1985). Il semble que l'astrocytose Alzheimer de type II soit directement proportionnelle à la quantité d'ammoniaque à laquelle les astrocytes sont exposés tant *in vivo* (Taylor, P. *et al.* 1979) qu'*in vitro* (Gregorios, J.B. *et al.* 1985).

Il est intéressant de noter que dans notre étude, l'astrocytose Alzheimer de type II est apparue suite à une exposition à des concentrations relativement modérées (pour le rat) d'ammoniaque plasmatique (300 µg/dl Tableau 2.3). En effet, chez le rat cette atteinte survient parfois à des concentrations d'ammoniaque de 300 à 400 µg/dl mais le plus souvent à des niveaux bien plus considérables d'environ 1000 µg/dl (Tableau 1.1). Ce n'est pas le cas chez le singe ou l'humain, chez qui on voit clairement une astrocytose Alzheimer de type II à des concentrations plasmatiques de 200 à 300 µg/dl (Cole, M. *et al.* 1972; Martin, H. *et al.* 1987; Taylor, P. *et al.* 1979)

Il est remarquable que très peu d'astrocytes Alzheimer de type II apparaissent chez les animaux du groupe anastomosé jeune, alors qu'ils avaient des niveaux d'ammoniaque plasmatique comparables à leur contrepartie chez les vieux. Ceci pourrait s'expliquer par une augmentation basale de l'ammoniaque cérébrale avec l'âge qui a déjà été décrite chez des animaux normaux (Kirzinger, S.S. et Fonda, M.L. 1978; Rajeswari, T.S. et Radha, E. 1984) et qui viendrait s'ajouter à l'ammoniaque résultant de l'APC.

N'ayant pas mesuré la concentration d'ammoniaque cérébrale chez nos animaux, on ne peut que formuler des hypothèses pour tenter d'expliquer l'apparition d'astrocytose Alzheimer de type II chez les rats âgés, mais très peu chez les jeunes, suite à une APC :

- 1) Il pourrait y avoir une augmentation cérébrale de l'ammoniaque suite à une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, par baisse du pH cérébral par exemple.
- 2) Il pourrait y avoir augmentation de la production ou baisse d'élimination de l'ammoniaque dans le cerveau.
- 3) Les mécanismes cellulaires impliqués dans l'apparition de l'astrocytose Alzheimer type II pourraient être plus sensibles à une même dose d'ammoniaque chez les rats âgés.
- 4) Un facteur autre que l'ammoniaque serait impliqué dans l'apparition de cette astrocytose chez les animaux âgés.

Des recherches plus approfondies sur la concentration d'ammoniaque, son métabolisme, son passage au niveau de la barrière hémato-encéphalique ainsi que sur le pH cérébral, pourrons sans doute éclaircir ce point.

Comme déjà mentionné en introduction, l'astrocytose Alzheimer de type II ne peut être mise en évidence que si les tissus ont été fixés par immersion. Certains auteurs ont suggéré qu'elle était en partie le fruit d'une autolyse post-mortem, expliquant sa prépondérance dans les couches profondes du cortex qui devraient en principe être fixées plus tardivement que les couches plus superficielles (Norenberg, M.D. 1981). Lorsque le tissu cérébral de rats ayant une APC est fixé rapidement par perfusion *in vivo*, on ne peut observer d'astrocytose Alzheimer de type II. Par contre, on constate une lobulation des noyaux qui est plus importante aux endroits où l'on retrouve normalement des astrocytes Alzheimer de type II, comme dans les couches profondes du cortex (Cavanagh, J.B. et Kyu, M.H. 1971). Afin de vérifier l'hypothèse de l'autolyse, cette équipe a aussi comparé le fait de fixer les tissus par immersion après un délai d'une heure entraînant une augmentation du volume nucléaire moyen chez les animaux contrôles (perfusion $91 \pm 4 \mu^3$, immersion $99 \pm 3 \mu^3$) mais une augmentation bien plus considérable chez les rats avec une APC (perfusion $87 \pm 3 \mu^3$, immersion $124 \pm 11 \mu^3$). Ces auteurs rapportent également le cas d'un animal chez qui ils ont trouvé des astrocytes Alzheimer de type II malgré que les tissus aient été fixés par perfusion. Il est apparu que cet animal avait des nécroses focales dans le foie suite à l'APC et avait une concentration plasmatique d'ammoniaque de $1389 \mu\text{g}/100\text{ml}$ (normale $40-100 \mu\text{g}/100\text{ml}$).

Ces données montrent qu'il y a effectivement un effet de la fixation des tissus sur l'apparition d'astrocytose Alzheimer de type II, mais que l'autolyse n'est probablement pas aussi importante que l'on ne pourrait croire. Les changements à l'origine du gonflement et de la lobulation du noyau pourraient être liés à une modification de la stabilité de la membrane nucléaire ou de la viscosité du nucléoplasme. L'augmentation de la taille du noyau suite à une fixation lente permet de croire qu'une augmentation de l'osmolarité dans le

nucléoplasme crée une infiltration d'eau après la mort (Cavanagh, J.B. et Kyu, M.H. 1971). Comme on ne connaît pas encore exactement les mécanismes cellulaires impliqués dans l'apparition de l'astrocytose Alzheimer de type II, on ne peut savoir avec certitude pour quelle raison ils sont en plus grand nombre chez les rats âgés ayant une APC.

Toutefois, il est remarquable que dans le cytoplasme des astrocytes Alzheimer de type II on retrouve souvent des inclusions de lipofucine (Norenberg, M.D. 1981). Comme il a été mentionné en introduction, ce pigment augmente dans le cytoplasme avec l'âge et serait le résultat de l'accumulation progressive de protéines et de lipides ayant subi une peroxydation (Mrak, R.E. *et al.* 1997). Il est possible que les astrocytes soient exposés à une surcharge de radicaux libres dont la source pourrait être la production excessive de NO. En effet, l'activité de l'enzyme produisant le NO dans les neurones est augmenté dans le cortex (65%), le cervelet (54%), le striatum (64%) et l'hippocampe (88%) de jeunes rats adultes suite à une APC (Rao, V.L. *et al.* 1995). S'il y a effectivement une augmentation de la production de radicaux libres dans les astrocytes suite à une exposition à l'ammoniaque, il semble logique que les individus âgés qui ont des mécanismes de défense contre l'oxydation moins efficaces (Harman, D. 1996), soient plus touchés.

Il est évident que la plus grande présence d'astrocytose Alzheimer type II chez les rats âgés suite à l'APC soit le signe d'une atteinte astrocytaire plus importante que chez les jeunes. Dans l'état actuel de nos connaissances, les mécanismes impliqués dans l'apparition de cette atteinte restent flous. À plus forte raison, nous ne connaissons pas encore les processus conduisant à l'apparition d'une plus grande quantité d'astrocytes Alzheimer de type II chez les rats âgés ayant une APC.

3.2 UTILISATION LOCALE DU GLUCOSE CÉRÉBRAL (ULGC)

Nos résultats montrent qu'il y a des modifications plus étendues d'ULGC chez les rats âgés ayant une APC. Alors que la baisse d'ULGC était confinée au cortex frontal chez les jeunes animaux ayant une APC, les changements chez les vieux rats ayant une APC s'étendent au cortex frontal et pariétal ainsi qu'au thalamus (Tableau 2.2). Ces résultats révèlent qu'il y a une redistribution du métabolisme des régions corticales vers les régions sous-corticales telles que le thalamus. Des données similaires, montrant qu'il y a une redistribution du métabolisme et du flux sanguin cérébral vers les régions sous-corticales chez les patients souffrant d'une dégénérescence hépatique et d'EPS légère, ont déjà été publiées (Lockwood, A.H. *et al.* 1991a).

Cette plus grande étendue des changements d'ULGC chez les rats âgés ayant une APC pourrait théoriquement être le fruit d'une baisse de la concentration de glucose plasmatique chez ces animaux, qui pourrait avoir une influence sur la constante "globale" (lumped constant) utilisée dans le calcul de l'ULGC par la méthode du ^{14}C -désoxyglucose (Sokoloff, L. *et al.* 1977). Toutefois, ceci est improbable car : 1) la chute du glucose plasmatique est comparable entre les rats APC jeunes et vieux lorsque comparée à leur groupe contrôle respectif 2) des études antérieures utilisant la méthode du ^{14}C -désoxyglucose ont montré que les valeurs de cette constante globale n'étaient pas modifiées jusqu'à 12 semaines après une APC et ce malgré que les concentrations de glucose plasmatiques aient été abaissées de 40% (Cruz, N.F. et Diemel, G.A. 1994; Cruz, N.F. et Duffy, T.E. 1983).

La réduction de 22% d'ULGC que nous avons observée dans le cortex frontal

de rats âgés suite à l'APC est du même ordre de grandeur (26%) que celle observée par d'autres auteurs dans le même modèle animal jeune (Eklof, B. *et al.* 1974). De plus, cette baisse d'ULGC est similaire à la réduction du taux cérébral d'utilisation de l'oxygène (20%) observée chez de jeunes rats suite à l'APC (Nieto, C. *et al.* 1980). Des baisses généralisées de 20 à 30% de l'ULGC lorsque mesurée avec la méthode du ^{14}C -glucose plutôt qu'avec la méthode du ^{14}C -désoxyglucose ont aussi été rapportées suite à une APC chez de jeunes animaux (Mans, A.M. *et al.* 1983).

On est en droit de se demander si les changements d'ULGC chez les rats vieux et jeunes suite à une APC sont la conséquence de la toxicité de l'ammoniaque. L'observation d'une réduction de l'ULGC dans le cortex cérébral de rats normaux exposés à de l'ammoniaque est en faveur d'une telle éventualité (Lockwood, A.H. *et al.* 1982). Toutefois, l'augmentation de l'ammoniaque plasmatique que nous avons observée suite à l'APC était comparable tant chez le groupe jeune que le groupe âgé. De plus, une étude antérieure a démontré qu'il n'y a pas de corrélation entre les changements d'ULGC et les niveaux plasmatiques d'ammoniaque chez des rats ayant subi une APC (Cruz, N.F. et Duffy, T.E. 1983). Par contre, il a été démontré que l'ammoniaque cérébrale est significativement augmentée avec l'âge chez des animaux normaux (Kirzinger, S.S. et Fonda, M.L. 1978; Rajeswari, T.S. et Radha, E. 1984). Il est possible que suite à l'APC un accroissement supplémentaire de l'ammoniaque cérébrale survienne chez les animaux âgés, conduisant à des niveaux neurotoxiques.

L'augmentation considérable des RBTP chez le groupe âgé suite à l'APC pourrait conduire à une augmentation des niveaux de neurostéroïdes chez ces animaux et provoquer une neuro-inhibition via l'augmentation de l'activité des

récepteurs GABA_A. Finalement, cette neuro-inhibition pourrait se refléter sur la consommation de glucose et fournir une explication plausible de la plus grande étendue des changements d'ULGC chez les vieux animaux avec une APC.

De manière similaire, on observe un abaissement de l'ULGC chez les patients ayant une EPS minimale, lorsque mesurée par PET avec le ligand ¹⁸F—désoxyglucose (Lockwood, A.H. *et al.* 1993). De plus, les études de PET utilisant le ¹⁵O-H₂O comme traceur (Lockwood, A.H. *et al.* 1991a) ainsi que la tomographie à émission monophotonique (SPECT) (O'Carroll, R.E. *et al.* 1991) ont permis de mettre en lumière des réductions du flux sanguin cérébral dans les régions corticales et sous-corticales chez les patients souffrant de maladies hépatiques chroniques. L'étude de SPECT a également corrélié le degré de l'atteinte cognitive avec les anomalies de flux sanguin cérébral dans les noyaux gris de la base et le cortex limbique (O'Carroll, R.E. *et al.* 1991).

Nos données montrent que l'âge en soit ne produit pas de changements notables de l'ULGC des animaux contrôles. Ceci est en accord avec une étude montrant qu'il n'y a pas de changements de l'ULGC dans le cortex frontal chez le rats jusqu'à 36 mois d'âge (Smith, C.B. *et al.* 1980).

Curieusement, les réductions d'ULGC notées dans le cortex frontal et frontopariétal des rats âgés ayant une APC ont été accompagnées d'une hausse légère mais significative au niveau du thalamus. Une augmentation analogue d'ULGC (Lockwood, A.H. *et al.* 1993) et de flux sanguin cérébral (Lockwood, A.H. *et al.* 1991a) a été enregistrée au niveau du thalamus chez des patients avec une maladie de foie chronique. Comme le thalamus joue un rôle central dans le contrôle moteur et sensoriel, ces équipes ont suggéré que cette réorganisation métabolique pourrait représenter une augmentation

compensatoire de l'activité neuronale thalamique (Lockwood, A.H. *et al.* 1993). La réduction corticale d'ULGC et l'augmentation thalamique qui l'accompagne laissent penser que l'APC provoque des changements en ce qui concerne les fonctions thalamo-corticales.

Quoique pure spéculation pour le moment, on pourrait penser que les changements en ce qui à trait à l'ULGC pourraient être le reflet d'altérations au niveau des pompes membranaires ATP dépendantes des astrocytes. Ceci aurait comme conséquence une modification du milieu à l'intérieur de la cellule ou à l'intérieur du noyau et des mitochondries, conduisant au gonflement caractéristique des astrocytes Alzheimer de type II.

3.3 RÉCEPTEURS AUX BENZODIAZÉPINES DE TYPE PÉRIPHÉRIQUE

Nos résultats montrent qu'il y a un effet de l'âge et également un effet de l'APC sur l'augmentation des sites de liaison pour le ^3H -PK11195, un ligand spécifique des RBTP (Tableau 2.4). Il est généralement admis que les RBTP se retrouvent à la surface des mitochondries (Krueger, K.E. et Papadopoulos, V. 1992) et l'augmentation de ceux-ci pourrait être le reflet des changements mitochondriaux qui ont été décrits lors du vieillissement normal (Wei, Y.H. *et al.* 1998) ou suite à une APC (Norenberg, M.D. 1977).

Relativement peu d'études ont été entreprises pour vérifier l'effet du vieillissement normal sur l'expression et/ou la liaison aux RBTP. Une étude a montré que les sites de liaison pour le clonazépam (benzodiazépine) pouvant être déplacés par du RO5-6669 (benzodiazépine spécifique aux RBTP) ne sont augmentés que dans le cervelet chez les rats âgés (Komiskey, H.L. et MacFarlan, M.F. 1983). En fonction de l'âge on remarque également une

légère tendance à l'augmentation des sites de liaison pour les isoquinolines (PK-11195) sur les RBTP (Benavides, J. *et al.* 1990). Cette hausse n'a pu être observée qu'au niveau du cortex pariétal et n'atteignait pas tout à fait le seuil statistique. Une étude plus récente prétend démontrer qu'il y a une baisse des RBTP dans toutes les régions cérébrales, sauf le cervelet, chez des rats de 24 mois comparativement à des rats de 2 à 4 mois (Dalezios, Y. et Matsokis, N. 1998). Par contre, en plus d'avoir un effectif très réduit (3 à 6 animaux par groupe), cette équipe a déplacé du flunitrazépam (benzodiazépine) avec du PK-11195 (isoquinoline) mais les sites de liaison pour ces deux classes de composés ne sont pas forcément liés allostériquement.

Dans les études mentionnées plus haut, les animaux n'ont pas été manipulés ni laparatomisés comme les nôtres qui ont été pesés presque quotidiennement et ont subi un stress chirurgical important. On sait que la densité des RBTP est augmentée suite à un stress aigu et qu'un stress chronique se traduit plutôt par une baisse de leur densité (Weizman, R. et Gavish, M. 1993). Dans le même ordre d'idée, on sait que l'âge a un effet sur la réponse au stress. Par exemple, l'augmentation des niveaux de prégnéolone et de progestérone induite dans le cortex par le stress est au moins deux fois plus importante chez les rats âgés (Barbaccia, M.L. *et al.* 1998). Il est possible que l'augmentation de la liaison de ^3H -PK11195 chez les rats contrôles âgés soit due à une réponse différente au stress. Pour s'en assurer, des études plus approfondies sur les niveaux de stéroïdes cérébraux et circulants devront être réalisées.

Il est intéressant de noter qu'il y a une augmentation astrocytaire de l'activité peroxydase endogène reliée au fer de l'hème lors du vieillissement normal (Schipper, H.M. 1991). Il y a peut-être un lien à faire entre cette augmentation

astrocytaire de l'hème avec l'âge et le fait que les RBTP ont été impliqués dans le transport de l'hème dans les mitochondries (Taketani, S. *et al.* 1995).

Le transport du cholestérol dans les mitochondries correspond à l'étape limitante dans la synthèse des neurostéroïdes (Baulieu, E.E. 1998) et l'on sait que l'activation des RBTP par leur ligand endogène (DBI) provoque une augmentation du transport de cholestérol dans les mitochondries (Papadopoulos, V. et Brown, A.S. 1995). Étant donné que beaucoup de neurostéroïdes sont de puissants agonistes des récepteurs GABA_A (Barker, J.L. *et al.* 1986; Demirgoren, S. *et al.* 1991; Lambert, J.J. *et al.* 1995; Majewska, M.D. 1992), il a été proposé que l'augmentation de l'expression des RBTP et du DBI dans l'EPS (Desjardins, P. *et al.* 1997; Desjardins, P. *et al.* 1999; Rothstein, J.D. *et al.* 1989) pourrait conduire à une augmentation de l'inhibition liée au GABA et expliquer l'état de conscience réduit observé lors de l'EPS.

Comme mentionné en introduction, il existe un nombre croissant de données suggérant qu'une augmentation du manganèse dans le cerveau des patients souffrant de maladies de foie chroniques soit impliquée dans la pathogenèse de l'EPS. En effet, le manganèse est augmenté d'environ 190% dans le globus pallidus de patients décédés des suites d'un coma hépatique (Pomier Layrargues, G. *et al.* 1995) et de 70% chez les rats suite à une APC (Rose, C. *et al.* 1999). On note chez environ 80% des patients cirrhotiques une hyperintensité pallidale en imagerie par RMN en T1 (Kulisevsky, J. *et al.* 1992) pouvant correspondre à l'augmentation de ce métal dans cette région cérébrale. En accord avec cette interprétation, les concentrations de manganèse dans le sérum de patients cirrhotiques présentant une hyperintensité pallidale en imagerie par RMN (T1), sont augmentées (Spahr, L. *et al.* 1996). Dans le même ordre d'idée, l'exposition de cultures

d'astrocytes à du manganèse provoque une augmentation des sites de liaison pour le ^3H -PK11195, apparemment par un mécanisme n'impliquant pas la transcription (Hazell, A.S. *et al.* 1999a).

L'hyperammoniémie en tant que telle paraît responsable de l'augmentation des sites de liaison pour le ^3H -PK11195. L'augmentation de la liaison pour le ^3H -PK11195, enregistrée chez des animaux hyperammonémiques à cause d'une déficience enzymatique congénitale, représente probablement une réponse astrocytaire de ces sites de liaison à l'hyperammoniémie chronique (Rao, V.L. *et al.* 1993).

Le fait que l'on observe une augmentation de la liaison du ^3H -PK11195 chez les animaux ayant une APC autant jeunes que vieux n'est pas étonnant et va dans le même sens que la littérature se rapportant à l'humain (Lavoie, J. *et al.* 1990) et le rat ayant une APC (Desjardins, P. *et al.* 1997; Desjardins, P. *et al.* 1999; Giguère, J.F. *et al.* 1992; Leong, D.K. *et al.* 1994; Rao, V.L. *et al.* 1994). Étant donné qu'il n'y a pas d'effet de l'âge sur les niveaux plasmatiques d'ammoniaque des groupes avec APC (Tableau 2.3), l'augmentation des sites de liaison pour le ^3H -PK11195 chez les vieux rats ayant une APC ne peut être expliquée directement par les niveaux plasmatiques d'ammoniaque. Cependant, il est démontré que la concentration d'ammoniaque dans le tissu cortical de souris sénescences est augmentée de 60% ainsi que le produit de sa détoxification, la Gln (20%) (Kirzinger, S.S. et Fonda, M.L. 1978). Chez le rat âgé, on note également une augmentation de 95% de l'ammoniaque cérébral mais une faible baisse (25%) de la Gln tissulaire (Rajeswari, T.S. et Radha, E. 1984). De manière similaire, nous avons noté une augmentation de la Gln de 100% entre les rats contrôles âgés et jeunes et une augmentation de 156% entre les rats ayant une APC âgés et jeunes (Tableau 2.5). Ceci

pourrait être l'indice indirect d'une augmentation d'ammoniaque cérébral dont il sera question plus loin.

Il paraît essentiel d'établir s'il existe un lien entre l'augmentation très marquée des RBTP suite à une APC et le signe distinctif de l'EH, soit l'astrocytose Alzheimer de type II. Malheureusement, personne à ce jour n'a cherché à vérifier s'il existe un lien entre ces deux phénomènes.

Une étude récente a démontré que la quantité de RBTP est proportionnelle à la capacité de prolifération de lignées cellulaires tumorales en culture et que l'inhibition des RBTP conduit à un ralentissement de la prolifération (Papadopoulos, A. *et al.* 2000). De manière similaire, on a montré que chez les cellules quiescentes les RBTP sont faiblement exprimés, alors qu'il y a une forte corrélation ($r=0.98$) entre leur apparition et le nombre de cellules en phase S (Sanger, N. *et al.* 2000). La phase S du cycle cellulaire correspond à la synthèse d'ADN avant la mitose, tout juste avant la disparition de l'enveloppe nucléaire. Quoique ces observations aient été faites dans un autre type cellulaire, on est en droit de se demander s'il n'y a pas un lien entre l'augmentation des RBTP et l'augmentation de la synthèse d'ADN observée chez les astrocytes Alzheimer de type II (Brumback, R.A. et Lapham, M.D. 1989), de même que les anomalies au niveau du noyau (Norenberg, M.D. 1981). Bien qu'étant pure spéculation pour le moment, il est possible que l'exposition des astrocytes à de fortes concentrations d'ammoniaque puisse conduire à la production de signaux intracellulaires caractéristiques de la phase S du cycle cellulaire.

Il serait extrêmement intéressant d'injecter de la ^3H -thymidine à des rats ayant subi une APC et d'effectuer un marquage immunohistochimique des RBTP sur le même tissu, afin de vérifier si l'augmentation de synthèse de l'ADN est

concomitante avec une augmentation des RBTP.

3.4 SYSTÈME DE NEUROTRANSMISSION GLUTAMATERGIQUE

3.4.1 Sites de capture pour le glutamate

La neurotransmission glutamatergique se termine par la capture du Glu relâché. Cette capture est effectuée par une famille de transporteurs de haute affinité pour le Glu dont cinq membres ont été clonés jusqu'à présent (GLAST/EAAT1, GLT1/EAAT2, EAAC1/EAAT3, EAAT4 et EAAT5) (Gegelashvili, G. et Schousboe, A. 1997). On a démontré de façon élégante que l'inhibition de la synthèse des transporteurs astrocytaires GLAST/EAAT1 et GLT1/EAAT2 *in vivo* par un traitement chronique avec des nucléotides anti-sens conduisait à une augmentation substantielle du Glu extracellulaire, alors que la même procédure pour le transporteur neuronal EAAC1/EAAT3 ne modifie pas significativement la quantité de Glu extracellulaire (Rothstein, J.D. *et al.* 1996). Comme GLT1/EAAT2 et GLAST/EAAT1 sont principalement astrocytaires, ceci suggère que la grande majorité de la capture est effectuée par les astrocytes.

De nombreux rapports contradictoires ont été publiés sur la capture du Glu ou l'expression des sites de capture en fonction de l'âge. Une baisse de la capture du Glu en fonction de l'âge a été décrite dans les mitochondries (Vitorica, J. *et al.* 1985), les synaptosomes (Najlerahim, A. *et al.* 1990; Price, M.T. *et al.* 1981; Wheeler, D.D. et Ondo, J.G. 1986) ou des tranches de cortex (Matsumoto, H. *et al.* 1982). Par contre, d'autres études n'ont pas rapporté de changement concernant la capture de Glu dans des synaptosomes (Gilad, G.M. *et al.* 1990; Palmer, A.M. *et al.* 1994) ou des tranches de cortex (Dawson,

R.J. *et al.* 1989) d'animaux âgés. Le fait que nous n'ayons pas observé de changements au niveau des sites de liaison pour le ^3H -D-aspartate (Figure 2.7) avec le vieillissement suggère que le fonctionnement du système de transport pour le Glu n'est pas altéré avec l'âge, ce qui n'exclut pas toutefois qu'il y ait des altérations de sa capacité d'adaptation.

L'étude de l'effet de l'ammoniaque sur l'expression et la fonction de ces transporteurs a donné, dans une certaine mesure, des résultats contradictoires. Nous n'avons pas observé de changements notables des sites de capture pour le Glu chez les animaux jeunes ayant une APC (Figure 2.7). Ceci est en accord avec les résultats d'une étude montrant qu'il n'y a pas de changement de la capture du Glu dans les synaptosomes provenant de rats rendus chroniquement hyperammoniémiques par la ligature partielle de la veine porte suivie d'une ligature des voies biliaires (Maddison, J.E. *et al.* 1996). Cependant, un mois suite à une APC, l'immuno-marquage de GLT1/EAAT2 est augmenté dans la couche granulaire du cervelet alors que l'immuno-marquage de GLAST/EAAT1 est diminué dans la couche moléculaire (Suárez, I. *et al.* 2000). L'immuno-marquage de GLT1/EAAT2 et de GLAST/EAAT1 était particulièrement intense sur les astrocytes directement en contact avec les cellules de Purkinje, laissant penser à un mécanisme de protection contre un afflux de Glu comme il a déjà été démontré *in vitro* suite à l'exposition chronique d'astrocytes à du Glu (Gegelashvili, G. *et al.* 1996). De plus, l'exposition de cultures d'astrocytes à des concentrations d'ammoniaque de l'ordre du millimolaire pendant 7 jours conduit à une baisse de la vitesse maximale de transport (V_{max}) du Glu (Bender, A.S. et Norenberg, M.D. 1996) ainsi qu'à une baisse de l'expression de GLAST/EAAT1 (Chan, H. *et al.* 2000).

Contrairement à une exposition chronique, une exposition aiguë à

l'ammoniaque entraîne généralement des changements à la baisse des différents types de transporteurs. Par exemple, une exposition aiguë de synaptosomes à l'ammoniaque provoque une chute du V_{max} (Oppong, K.N. *et al.* 1995) ou encore une baisse de la composante stimulée par le K^+ (Mena, E.E. et Cotman, C.W. 1985) de la capture du Glu. De manière similaire, on note un déclin de l'expression du sous-type GLAST/EAAT1 (Zhou, B.G. et Norenberg, M.D. 1999) et GLT1/EAAT2 (Norenberg, M.D. *et al.* 1997) suite à l'exposition aiguë de cultures d'astrocytes à de l'ammoniaque. *In vivo*, suite à l'induction d'une dégénérescence hépatique aiguë, on constate un abaissement autant au niveau de la liaison du 3H -D-aspartate, de l'ARNm que de la protéine GLT1/EAAT2 (Knecht, K. *et al.* 1997; Norenberg, M.D. *et al.* 1997). Dans un même ordre d'idée, la baisse de la capture du Glu qui est observable dans les tranches d'hippocampe de rats normaux (Schmidt, W. *et al.* 1993; Schmidt, W. *et al.* 1990) ou d'humains morts des suites d'un coma hépatique (Schmidt, W. *et al.* 1990), suite à l'exposition à du sérum ou du LCR venant de patients encéphalopathes, est proportionnelle à la quantité d'ammoniaque contenue dans ces échantillons.

Ces résultats mettent en évidence les différences entre une dégénérescence hépatique chronique ou aiguë sur les sites de capture pour le Glu et pourraient représenter une adaptation du cerveau à des niveaux accrus d'ammoniaque ou de Glu.

Une augmentation de la concentration de Glu dans le LCR (Therrien, G. et Butterworth, R.F. 1991; Van Sande, M. *et al.* 1970; Vergara, F. *et al.* 1974; Watanabe, A. *et al.* 1984) ainsi que de la relâche du Glu (Butterworth, R.F. *et al.* 1991; Moroni, F. *et al.* 1983; Tossman, U. *et al.* 1987) a déjà été décrite dans l'EPS. Cette augmentation de la libération de Glu pourrait également

être le fruit d'une baisse de la capture ou d'un renversement du flux de Glu à travers le transporteur causé par une atteinte énergétique. Rappelons que le transport du Glu est dépendant du gradient ionique et des études ont déjà décrit un renversement du transport suite à un déficit énergétique (Gemba, T. *et al.* 1994). Cependant, un tel renversement semble improbable étant donné que dans notre modèle animal âgé, nous observons une augmentation de l'ULGC dans le thalamus (Tableau 2.2) alors qu'il y a une augmentation des sites de liaison pour le $^3\text{H-D-aspartate}$ (données non montrées) suite à l'APC.

Inversement, une augmentation de la capture du Glu pourrait occasionner une demande énergétique accrue. Chez les animaux âgés, nous observons plutôt une chute de l'ULGC dans le cortex (Tableau 2.2) concomitante à une augmentation des sites de liaison pour le $^3\text{H-D-aspartate}$ (Figure 2.7) suite à l'APC. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que des cultures d'astrocytes, lorsqu'elles sont exposées à de fortes concentrations de Glu extracellulaire, vont utiliser ce Glu comme source d'énergie dans le cycle de Krebs (McKenna, M.C. *et al.* 1996; Swanson, R.A. *et al.* 1990). Cet effet est directement relié à la capture du Glu, étant donné qu'il peut être inhibé par des bloqueurs de la capture mais aucunement par des antagonistes des récepteurs glutamatergiques (Swanson, R.A. *et al.* 1990).

Au niveau cortical, nous avons observé chez les animaux âgés anastomosés une augmentation simultanée de la liaison pour le $^3\text{H-D-aspartate}$ (Figure 2.7) et du sous-type de transporteur du Glu GLT-1/EAAT2 (Figure 2.8). Par contre, aucune variation des niveaux d'ARNm pour GLT-1/EAAT2 (Figure 2.9) n'a pu être mise en lumière chez ces mêmes animaux, suggérant que l'effet de l'APC est post-transcriptionnel. Il est possible que les changements induits par l'anastomose rendent l'ARN plus stable, augmentent

sa lecture par les ribosomes ou encore réduisent la dégradation de la protéine GLT-1/EAAT2.

Les mécanismes de régulation des différents transporteurs pour le Glu n'ont pas encore été tout à fait élucidés. Un des problèmes majeurs tient au fait que les conditions de culture des astrocytes ou des neurones, ainsi que leur provenance et leur maturité, ont tous un effet sur l'expression de ces transporteurs *in vitro* (Gegelashvili, G. et Schousboe, A. 1997). On sait que le fait de cultiver des neurones avec des astrocytes fait augmenter de beaucoup l'expression de GLAST/EAAT1 et GLT-1/EAAT2 chez ces derniers, via la libération par les neurones d'un facteur soluble (Schlag, B.D. *et al.* 1998). Il semble que l'augmentation de l'expression de ces transporteurs par le dibutyryl-cAMP (un activateur des protéines kinases cAMP dépendantes) et le facteur neuronal passent par des voies de signalisation convergentes mais leur effet n'est pas additif (Schlag, B.D. *et al.* 1998). Des données récentes laissent penser que les neurones sont en mesure de dicter partiellement l'expression astrocytaire de ces transporteurs en sécrétant un peptide (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)) qui active la protéine kinase A et C (Figiel, M. et Engele, J. 2000).

Ces données montrent à quel point l'expression des transporteurs pour le Glu est sous un contrôle étroit, autant dans les neurones que les astrocytes. Il est fort possible que l'ammoniaque de manière directe ou indirecte puisse interférer avec une ou plusieurs des multiples facettes de ce contrôle. Comme déjà mentionné plus haut, l'effet de l'ammoniaque sur ces transporteurs semble être différent selon que l'exposition est aiguë ou chronique. De plus, lorsqu'on expose des cultures d'astrocytes de manière aiguë à des concentrations physiopathologiques de manganèse et d'ammoniaque, on

observe une réduction de la capture du Glu et les effets de ces deux composés semblent être cumulatifs (Hazell, A.S. et Norenberg, M.D. 1997). Comme le manganèse paraît être impliqué dans la pathogenèse de l'EPS (Pomier Layrargues, G. *et al.* 1998; Rose, C. *et al.* 1999; Spahr, L. *et al.* 1996) et qu'il est augmenté dans le cerveau de rats vieillissants (Takeda, T. *et al.* 1996), il semble logique de penser que le manganèse, de concert avec l'ammoniaque, pourrait être impliqué dans les altérations des sites de transport de Glu observées ici avec l'âge chez les animaux ayant une APC. Malgré que de nombreuses études sur l'accumulation de manganèse dans les noyaux gris de la base de patients encéphalopathes aient été réalisées dernièrement, l'examen de l'influence de l'âge sur ce paramètre fait encore défaut.

D'autre part, il existe des données à l'effet que le manganèse participe au stress oxydatif et à la formation de radicaux libres (Desole, M.S. *et al.* 1995; Sun, A.Y. *et al.* 1993). Il est également bien connu que le vieillissement provoque une augmentation de la production et/ou un déclin des moyens de défense de l'organisme contre les radicaux libres (Lynch, M.A. 1998; Peinado, M.A. 1998). De surcroît, les radicaux libres font interférence avec la capture du Glu (Piani, D. *et al.* 1993; Trotti, D. *et al.* 1996; Volterra, A. *et al.* 1994) possiblement par l'oxydation de groupements thiols sur la protéine (Hexum, T.D. et Fried, R. 1979). L'étude du stress oxydatif, des mécanismes de défenses anti-oxydants, ainsi que des concentrations de manganèse en fonction de l'âge et de l'APC, pourra peut-être élucider les mécanismes impliqués.

Afin d'influencer la réponse post-synaptique, les transporteurs du Glu doivent réagir rapidement à l'augmentation du Glu dans la fente synaptique. Pourtant, malgré qu'ils nécessitent plus de 60 ms afin de compléter un cycle (Lester,

H.A. *et al.* 1996), leur inhibition conduit à une augmentation des courants excitateurs post-synaptiques, impliquant qu'ils sont en mesure d'influencer la concentration de Glu dans les premiers centièmes de μs (Ottersen, O.P. *et al.* 1998). Ceci conduit à l'hypothèse que dans un premier temps les transporteurs séquestrent rapidement le Glu puis ils le transportent à l'intérieur des astrocytes ou des neurones (Conti, F. et Weinberg, R.J. 1999). Donc, une variation de leur expression et du nombre de sites de liaison pour le Glu, représentés par le ^3H -D-Aspartate, peut avoir une énorme influence tant sur le métabolisme du Glu que sur les courants post-synaptiques excitateurs.

Pour conclure, cette augmentation des sites de capture pour le Glu chez les rats âgés ayant subi une APC n'est pas le fruit d'une augmentation du nombre d'astrocytes tels que le démontrent les comptes astrocytaires réalisés chez ces animaux (Résultats, Article 2). Ces modifications semblent représenter une adaptation du cerveau vieillissant aux effets de l'anastomose.

3.4.2 Sites de liaison pour le ^3H -MK801 et le ^3H -AMPA

Nos données montrent qu'il y a une baisse en fonction de l'âge de la liaison corticale du ^3H -MK801, un composé se liant spécifiquement à l'intérieur du canal des récepteurs NMDA (Figure 2.10). La littérature à ce sujet est assez claire et montre qu'il y a une baisse des récepteurs NMDA dans le cortex avec l'âge (Magnusson, K.R. 1995; Magnusson, K.R. et Cotman, C.W. 1993a; Magnusson, K.R. et Cotman, C.W. 1993b; Mitchell, J.J. et Anderson, K.J. 1998; Peterson, C. et Cotman, C.W. 1989; Tamaru, M. *et al.* 1991). De plus on note une baisse de l'effet du Glu sur la liaison du ^3H -MK801 à l'intérieur du canal, suggérant que la conformation ou la composition de ces récepteurs est

changée lors du vieillissement normal (Mitchell, J.J. et Anderson, K.J. 1998). En ce qui concerne les récepteurs AMPA, on note également une baisse avec l'âge mais de beaucoup moins grande envergure (Magnusson, K.R. 1997; Magnusson, K.R. et Cotman, C.W. 1993a; Tamaru, M. *et al.* 1991). Pareillement, nos résultats montrent qu'il y a une tendance à la baisse des récepteurs AMPA avec l'âge, mais celle-ci n'a pas atteint le seuil statistique (Figure 2.11).

Quoiqu'il y ait une légère tendance à la baisse des récepteurs NMDA et AMPA suite à l'effet de l'APC, celle-ci n'atteignait pas le seuil statistique (Figures 2.10 et 2.11). Ces résultats sont un peu à l'image des résultats contradictoires observés pour ces types de récepteur dans les différents modèles d'EPS. En effet, suite à une APC on a observé une diminution des sites de liaison pour le ^3H -Glu pouvant être déplacés avec du NMDA dans la plupart des régions cérébrales tandis qu'aucun changement n'a été noté pour les récepteurs AMPA (Peterson, C. *et al.* 1990). Dans le même modèle animal, une baisse de l'immuno-marquage des sous-unités GluR2/3 des récepteurs AMPA a été notée dans les cellules de Purkinje alors qu'il y avait une augmentation des sous-unités GluR1 dans les astrocytes de Bergmann (Suárez, I. *et al.* 1997). Par contre, chez des chiens ayant une APC congénitale, aucun changement au niveau des sites AMPA n'a pu être mis en évidence dans le cervelet (Maddison, J.E. *et al.* 1991), alors qu'il y avait une perte des sites AMPA de basse affinité dans le cortex (Maddison, J.E. *et al.* 1991). Ces incohérences sont probablement liées aux différentes techniques utilisées ainsi qu'à la variabilité des modèles animaux étudiés.

3.4.3 Acides aminés dans le tissu cortical

Nous avons observé une plus grande augmentation de l'accumulation de Gln dans le cortex de rats âgés suite à une APC (Tableau 2.5). Une pareille augmentation de l'accumulation de Gln a été notée dans des tranches de cerveau provenant de rats âgés comparativement à des jeunes lorsqu'on les expose à des concentrations grandissantes d'ammoniaque (Wallace, D.R. et Dawson, R.J. 1992).

En outre, il a été démontré que l'ammoniaque tissulaire est augmenté (Kirzinger, S.S. et Fonda, M.L. 1978; Rajeswari, T.S. et Radha, E. 1984) et que la Gln est soit augmentée (Kirzinger, S.S. et Fonda, M.L. 1978), inchangée (Dawson, R.J. *et al.* 1989), ou légèrement diminuée (Rajeswari, T.S. et Radha, E. 1984) dans le tissu cérébral d'animaux sénescents. Nous avons noté une augmentation de la Gln de 100% entre les rats contrôles âgés et jeunes et une augmentation de 156% entre les rats ayant une APC âgés et jeunes (Tableau 2.5). Cette augmentation basale de Gln pourrait s'ajouter à la Gln venant de la détoxification de l'ammoniaque suite à l'APC.

Il semble y avoir une contradiction entre l'augmentation de Gln que nous observons chez les rats âgés ayant une APC par rapport aux jeunes et le fait qu'il n'y ait pas de différence entre leur concentration d'ammoniaque plasmatique. On peut penser à certains mécanismes qui pourraient potentiellement être impliqués, soit:

- 1) Une augmentation cérébrale de l'ammoniaque suite à une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, par baisse du pH cérébral ou intracellulaire par exemple.
- 2) Une augmentation de la production d'ammoniaque dans le cerveau ou

baisse de l'élimination de la Gln.

- 3) Les mécanismes cellulaires impliqués dans le contrôle du cycle glutamate-glutamine ou de la GS sont plus sensibles à une même dose d'ammoniaque chez les rats âgés.
- 4) Un facteur autre que l'ammoniaque serait impliqué.

Nous avons également discerné une légère baisse de la quantité de Glu dans le cortex des rats âgés contrôles (Tableau 2.5) ce qui est en accord avec les données de la littérature (Dawson, R.J. *et al.* 1989).

Des études ont montré qu'il y a une augmentation du passage et du métabolisme de l'ammoniaque dans le cerveau de patients cirrhotiques (Lockwood, A.H. *et al.* 1991b) ainsi que chez les rats ayant une APC (Dejong, C.H. *et al.* 1993a; Gjedde, A. *et al.* 1978). Quoique les concentrations plasmatiques d'ammoniaque soient similaires entre les groupes anastomosés jeunes et vieux, il est possible qu'il y ait une altération de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique chez les vieux.

3.5 PERSPECTIVES CLINIQUES ET PISTES DE RECHERCHES

Bien que les résultats présentés ici soient en accord avec les données cliniques montrant qu'un âge avancé prédispose à l'EH, on se doit de tenir compte des limitations du modèle animal. Comme dans tout modèle animal, il existe des différences propres aux espèces comparées qu'on ne peut rejeter du revers de la main. À titre d'illustration, la consommation excessive d'alcool

sur de longues périodes produit fréquemment une cirrhose chez l'humain alors que chez le rat aucune cirrhose ne peut être induite de cette manière, peu importe la dose et la durée d'exposition. Toujours au chapitre des différences entre les espèces, on peut s'attendre à ce que le métabolisme énergétique cellulaire soit semblable chez la plupart des mammifères, mais il n'en va pas nécessairement de même pour la réponse au stress, les changements hormonaux ou certains autres mécanismes cellulaires.

Ceci dit, les rats ayant une APC demeurent un excellent modèle d'EH chronique mais doivent être considérés pour ce qu'ils sont, c'est-à-dire une modélisation de l'atteinte humaine. Loin d'empêcher l'extrapolation chez l'humain, le modèle animal peut alors servir d'outil pour baliser les pistes de recherche cliniques.

Une des découvertes majeures de cette étude est que le niveau plasmatique d'ammoniaque est identique chez les rats ayant une APC dans les deux groupes d'âge, bien qu'il y ait une plus grande vulnérabilité du groupe âgé à l'EH. Cette observation a des répercussions cliniques évidentes en ce qui concerne le contrôle de la concentration d'ammoniaque circulant chez les patients âgés. Elle soulève aussi la question de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique chez ces patients. Comme l'excellente étude de Lockwood (1991b), on devrait utiliser le PET avec le traceur ^{13}N -ammoniaque afin de déterminer s'il y a une augmentation du produit de perméabilité-surface de la barrière hémato-encéphalique chez les patients âgés. De la même manière, on pourrait calculer l'extraction cérébrale ou la différence artério-veineuse de l'ammoniaque et de son produit de détoxification, la Gln, chez des rats âgés ayant une APC. Cette information sur la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique est extrêmement importante tant pour les

implications cliniques que pour notre compréhension de la pathogenèse de l'EH.

S'il s'avérait que la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique était plus grande chez les patients âgés ou que ceux-ci sont simplement plus sensibles à une même concentration d'ammoniaque, il est clair qu'une attention particulière devra être accordée aux niveaux plasmatiques d'ammoniaque. Le choix de la thérapie envisagée pour ce sous-groupe de patients sera alors difficile. En effet, le contrôle de l'hypertension portale par un TIPS provoque nécessairement une augmentation de la concentration d'ammoniaque circulant, quoiqu'on puisse minimiser cet effet en réduisant la taille de la dérivation portale. Par ailleurs, l'hypertension portale peut provoquer des varices œsophagiennes conduisant à des saignements gastro-intestinaux qui font également augmenter la charge d'ammoniaque. La cautérisation de ces varices par sclérothérapie permet de limiter quelque peu les saignements, mais s'ils réapparaissent chez un patient âgé, donc plus vulnérable, l'issue pourrait être plus grave que chez un patient plus jeune.

Évidemment, la solution la plus souhaitable reste la transplantation hépatique orthotopique. Si cette avenue demeure la plus fiable, elle est surtout envisagée pour les patients avec une insuffisance hépatique fulminante. Vu la forte demande et le peu de donneurs, les délais d'obtention d'un foie pour fin de transplantation chez des patients ayant une atteinte chronique sont longs.

S'il s'avère que les patients plus âgés sont plus sensibles à des niveaux plasmatiques d'ammoniaque élevés, comme le suggère la présente étude, et qu'en conséquence un TIPS ou une sclérothérapie sont trop risqués, on devra avoir recours à des stratégies de réduction de l'ammoniaque. Puisque la majorité de l'ammoniaque se retrouvant dans la veine porte provient de

l'activité bactérienne dans l'intestin, diverses stratégies ont été élaborées afin de réduire cette production ou accélérer son élimination. On peut par exemple, chercher à diminuer l'ammoniaque en contrôlant la diète, en réduisant la production intestinale, en favorisant son élimination ou encore en modifiant la flore intestinale.

Il est assez simple de réduire l'apport de protéines dans la diète dans le but de limiter l'apport d'azote et la production d'ammoniaque. Sans entrer dans les détails, disons que le contrôle de la production d'ammoniaque peut se faire via l'utilisation d'antibiotiques comme la néomycine, bien que le traitement à long terme (plus d'un mois) pose parfois certains problèmes de néphrotoxicité (Ferenci, P. 1991). D'autres antibiotiques sont toutefois disponibles, comme le métronidazole, l'aminopénicilline et la vancomycine. On peut également contourner le cycle de l'urée par l'administration de benzoate de sodium qui a la propriété de se lier à la glycine, elle-même en équilibre avec l'ammoniaque plasmatique, afin de former de l'hippurate. L'effet net du benzoate de sodium est donc d'acheminer l'azote provenant de l'ammoniaque vers la glycine et l'hippurate qui est un composé fortement excrété par le rein (Mendenhall, C.L. *et al.* 1986).

Si les patients plus âgés sont effectivement plus vulnérables et développent plus facilement les symptômes de l'EH, on devra veiller à dépister les premiers signes de l'évolution de la maladie. Des tests de dépistage très sensibles, comme le " trail score test " où l'on demande au patient de relier rapidement par une ligne des points numérotés, peuvent être utilisés afin de réagir promptement à tout signe d'aggravation de l'état neurologique. Ces tests ne sont pas forcément utilisés dans la pratique de tous les jours, mais seront peut-être nécessaires pour assurer le suivi des patients plus vieux.

À la lumière des données d'ULGC chez les rats âgés ayant une APC, il serait intéressant de vérifier si la redistribution du métabolisme cérébral des régions corticales vers le thalamus, déjà observée chez les patients encéphalopathes (Lockwood, A.H. *et al.* 1991a ; 1993), est plus étendue ou plus sévère en fonction de leur âge. Malgré des efforts de recherche soutenus sur la cause de ces dérangements métaboliques chez les patients atteints d'EH, on ne connaît encore que très peu de choses à ce sujet. Toutefois, on s'accorde pour dire qu'ils pourraient être la cause des déficits de perception visuo-spaciale qui limitent la capacité de ces patients à accomplir des tâches comme la conduite d'une voiture (Lockwood, A.H. *et al.* 1993). L'utilisation du PET et du traceur ^{18}F -désoxyglucose chez des patients encéphalopathes classés en fonction de leur âge, pourrait ouvrir de nouveaux horizons de recherche et déboucher potentiellement sur des applications cliniques.

Il est manifeste que les changements observés lors de l'EH sont principalement astrocytaires et les observations rapportées dans le présent ouvrage vont en ce sens. Toutefois les mécanismes conduisant à l'apparition d'astrocytose Alzheimer de type II ne sont toujours pas élucidés. Il apparaît évident que les efforts de recherche devraient se concentrer sur les sous-compartiments de l'astrocyte où l'on observe les changements les plus convaincants, comme le noyau et la mitochondrie. À ce titre, il est fort intéressant de constater que les changements d'ULGC et de densité des RBTP décrits ici, ont comme substrat, la mitochondrie.

Néanmoins, on est en droit de se demander si l'augmentation du nombre de sites de liaison pour le ^3H -PK11195 chez les animaux ayant une APC est le reflet d'une augmentation du nombre de sites par mitochondrie ou représente une augmentation du nombre de mitochondries par astrocyte. Rappelons que

dans les astrocytes Alzheimer de type II on note une augmentation du nombre de mitochondries. Cette augmentation pourrait être une tentative de la cellule de combler le déficit engendré par un métabolisme énergétique compromis par l'ammoniaque. Une expérience toute simple, que nous n'avons pas pu réaliser faute de temps et de tissu, pourrait nous fournir la réponse. Il suffirait d'isoler par centrifugation différentielle les mitochondries d'une région cérébrale riche en astrocytes Alzheimer de type II, puis de mesurer la consommation de glucose ou la densité des sites de liaison pour le ^3H -PK-11195. En exprimant les résultats en fonction de la quantité de protéines mitochondriales, on pourrait avoir une idée plus précise de l'effet de l'APC sur la mitochondrie.

Pareillement, l'utilisation d'émulsion photographique directement sur les tranches de tissu permettrait de visualiser la localisation cellulaire, ou même subcellulaire, des changements que nous avons observés par autoradiographie traditionnelle. Quoique plus longue et techniquement plus difficile, cette approche aurait l'avantage de mettre en lumière les changements dans leur contexte cellulaire en évitant la dilution du signal au niveau d'une région cérébrale entière.

Si la présente étude a le défaut d'avoir abordé la question de la vulnérabilité des rats âgés à l'EH sous différents angles, ne permettant pas nécessairement de tisser des liens serrés entre les divers résultats, elle a néanmoins l'avantage de montrer qu'à plusieurs niveaux les rats âgés ont une atteinte plus grande que les jeunes suite à l'APC.

3.6 CONCLUSIONS

- 1- Nos données montrent qu'il y a une baisse de l'activité ambulatoire spontanée nocturne chez les rats ayant une APC des deux groupes d'âge, en accord avec la littérature sur ce modèle animal jeune adulte (Figure 2.1). Une baisse significative de l'activité ambulatoire spontanée diurne a également été notée chez les vieux animaux ayant subi une APC comparativement à leur groupe contrôle. Ce changement comportemental pourrait être le reflet d'une plus grande vulnérabilité des animaux âgés aux effets d'une APC.
- 2- L'atrophie hépatique suite à l'APC était de la même ampleur chez les animaux âgés et jeunes adultes (Tableau 2.1). L'augmentation de l'ammoniaque plasmatique était également équivalente chez les deux groupes d'âge ayant subi la dérivation portale, (Tableau 2.1). De la même manière, l'APC a conduit à une réduction de la pression artérielle, à une baisse du glucose sanguin, à une baisse de la pression partielle du CO₂ et à une hausse de la pression partielle de l'oxygène de la même envergure chez les animaux âgés ou jeunes adultes (Tableau 2.1).
- 3- Une astrocytose Alzheimer de type II a été notée dans le cortex de rats âgés suite à l'APC (Figure 2.3). L'astrocytose Alzheimer de type II a été observée sporadiquement chez les jeunes rats adultes ayant une APC alors qu'ils avaient des niveaux plasmatiques d'ammoniaque équivalents au groupe âgé correspondant. Il est possible que l'âge *per se* augmente la production d'ammoniaque cérébral ou limite sa détoxification, comme l'indique la littérature, et qu'un surcroît d'ammoniaque venant de l'APC soit suffisant pour induire une astrocytose Alzheimer de type II. Par contre, aucun changement au niveau du nombre d'astrocytes n'a été observé dans

le cortex chez tous les groupes.

- 4- Une baisse significative de l'ULGC a été observée dans le cortex frontal des jeunes rats adultes, 4 semaines après une APC (Tableau 2.2). Chez les vieux animaux, l'APC s'est traduite par une baisse plus étendue de l'ULGC dans le cortex frontal et fronto-pariétal ainsi que par une augmentation dans le thalamus (Tableau 2.2). Ces changements surviennent alors que l'augmentation d'ammoniaque plasmatique chez les groupes ayant une APC n'est pas significativement différente entre les jeunes et les vieux, quoiqu'une augmentation basale de l'ammoniaque cérébrale en raison de l'âge n'ait pas été exclue. Ces altérations des patrons d'ULGC avec l'âge chez les animaux ayant une APC pourraient être la conséquence d'un déséquilibre au niveau des neurotransmetteurs.
- 5- Nos résultats montrent qu'il y a une augmentation de la liaison du ^3H -PK11195, un ligand spécifique des RBTP, reliée tant à l'âge qu'à l'effet de l'APC (Tableau 2.4). Comme le nombre d'astrocytes corticaux n'a pas augmenté chez ces animaux, cette augmentation de la liaison du ^3H -PK11195 suggère qu'il y a une augmentation du nombre de RBTP par astrocyte. L'augmentation du nombre de RBTP suite à l'APC chez les jeunes adultes est en accord avec la littérature sur le sujet. Étant donné que les RBTP ont été impliqués dans la production de neurostéroïdes, et par le fait même dans le contrôle de l'excitabilité du système nerveux central, leur augmentation pourrait être reliée à la plus grande prévalence de l'EPS observée chez les patients âgés suite à un TIPS.
- 6- Une augmentation des concentrations de Gln et, dans une moindre mesure, de Glu a été noté dans le tissu cortical des rats des deux groupes d'âge suite à une APC (Tableau 2.5), cette hausse étant plus grande chez les

vieux animaux. Les concentrations tissulaires de tous les autres acides aminés étudiés n'ont pas été modifiées ni en fonction de l'âge, et ni en fonction de l'APC (Tableau 2.5).

- 7- Suite à une APC chez les rats âgés, nous avons observé une augmentation significative de la liaison du ^3H -D-aspartate aux transporteurs de Glu corticaux (Figure 2.7) et une augmentation concomitante de l'expression de GLT-1/EEAT2, un sous-type de ces transporteurs (Figure 2.8). Cette augmentation de GLT-1/EEAT2 au niveau de la protéine ne s'est pas accompagnée d'un changement au niveau de l'ARN_m suggérant que le mécanisme impliqué est post-transcriptionnel (Figure 2.9). Une telle augmentation ne fut pas observée chez les jeunes rats adultes suite à l'APC, suggérant que les animaux âgés sont plus vulnérables aux effets de l'APC.
- 8- La liaison des ligands ^3H -MK801 (Figure 2.10) et ^3H -AMPA (Figure 2.11) ne fut pas significativement altérée dans le cortex suite à l'APC dans les deux groupes d'âge. Ceci laisse à penser que l'augmentation de Glu observée dans le tissu cortical est intracellulaire et n'a pas d'effet sur les récepteurs NMDA et AMPA des membranes cellulaires.

En conclusion, on peut dire que l'ensemble des données présentées ici montre qu'il y a une plus grande vulnérabilité aux effets de l'APC chez les rats âgés comparativement aux jeunes rats adultes. Une des découvertes majeures de notre étude vient du fait que les changements observés chez les rats âgés suite à une APC, sont tous plus ou moins présents chez leur contrepartie jeune. Il apparaît donc que la plus grande présence d'EH chez

les rats âgés soit le fruit d'une plus grande expression des mécanismes impliqués chez les jeunes, et non pas le résultat d'un épiphénomène. Le cerveau âgé semble être, en conséquence, plus vulnérable aux effets de l'APC de façon intrinsèque.

En accord avec cette interprétation, les rats âgés à qui l'on a fait subir une APC ont exhibé une plus grande quantité d'astrocytes Alzheimer de type II, des changements plus étendus d'ULGC, une quantité plus grande de RBTP, une augmentation de Gln cérébrale et une augmentation des sites de capture pour le Glu, malgré qu'ils n'aient pas d'augmentation plus marquée d'ammoniaque plasmatique.

L'ensemble de ces données renforce la vision selon laquelle l'EH est une atteinte astrocytaire et mitochondriale. En effet, on retrouve une quantité accrue de mitochondries dans les astrocytes Alzheimer de type II et l'utilisation du glucose ainsi que les récepteurs pour les benzodiazépines de type périphérique se retrouvent au niveau de la mitochondrie. Il est intéressant de noter que l'accumulation de manganèse, dont on retrouve des concentrations appréciables dans les noyaux gris de la base lors d'EH, semble être également mitochondriale.

L'ampleur plus grande des changements observés chez les animaux âgés suite à l'anastomose, vient confirmer les données cliniques indiquant qu'il y a une plus grande prévalence de l'EH chez les patients plus âgés. Outre les implications cliniques en ce qui a trait au choix de la thérapie pour les patients âgés, ces données indiquent que le vieillissement normal du cerveau entraîne des changements cellulaires prédisposant à l'EH.

Ces nouvelles données ajoutent à notre compréhension du phénomène de

l'EH, mais soulèvent aussi de nombreuses questions en ce qui a trait aux mécanismes cellulaires qui en sont responsables et de leur plus grande sensibilité chez les patients âgés.

BIBLIOGRAPHIE

Adams, R.D. and Foley, J.M. (1953). The neurological disorder associated with liver disease. In: *Metabolic and Toxic Disease of the Nervous System.*, H.H. Merritt and C.C. Hare (Ed.) Baltimore, William and Wilkins. 198-237.

Anholt, R.R., Pedersen, P.L., De Souza, E. and Snyder, S.H. (1986). The peripheral-type benzodiazepine receptor. Localization to the mitochondrial outer membrane. *Journal of Biological Chemistry* **261** (2): 576-83.

Antkiewicz-Michaluk, L., Guidotti, A. and Krueger, K.E. (1988). Molecular characterization and mitochondrial density of a recognition site for peripheral-type benzodiazepine ligands. *Molecular Pharmacology* **34** (3): 272-8.

Aprikyan, G.V. and Gekchyan, K.G. (1988). Release of neurotransmitter amino acids from rat brain synaptosomes and its regulation in aging. *Gerontology* **34** (1-2): 35-40.

Araki, T., Kato, H., Nagaki, S., Shuto, K., Fujiwara, T. and Itoyama, Y. (1997a). Effects of vinconate on age-related alterations in [³H]MK-801, [³H]glycine, sodium-dependent D-[³H]aspartate, [³H]FK-506 and [³H]PN200-110 binding in rats. *Mechanisms of Ageing & Development* **95** (1-2): 13-29.

Araki, T., Kato, H., Shuto, K., Fujiwara, T. and Itoyama, Y. (1997b). Age-related changes of sodium-dependent D-[³H]aspartate and [³H]FK506 binding in rat brain. *Journal of Neural Transmission (Budapest)* **104** (2-3): 259-67.

Araki, T., Oshima, Y., Kato, H., Shuto, K. and Itoyama, Y. (1997c). Effect of NG-nitro-L-arginine on age-related changes of glutamate receptor systems and immunophilin in rats. *Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology* **19** (6): 373-81.

Arriza, J.L., Eliasof, S., Kavanaugh, M.P. and Amara, S.G. (1997). Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride

conductance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94** (8): 4155-60.

Aschner, M., Gannon, M. and Kimelberg, H.K. (1992). Manganese uptake and efflux in cultured rat astrocytes. *Journal of Neurochemistry* **58** (2): 730-5.

Azorin, I., Minana, M.D., Felipo, V. and Grisolia, S. (1989). A simple animal model of hyperammonemia. *Hepatology* **10** (3): 311-4.

Balazs, R., Patel, A.J. and Richter, D. (1973). Metabolic compartments in the brain: their properties and relation to morphological structures. In: *Metabolic compartmentation in the brain.*, R. Balazs and J.E. Cremer (Ed.) New York, Macmillan. 167-183.

Banay-Schwartz, M., Lajtha, A. and Palkovits, M. (1989). Changes with aging in the levels of amino acids in rat CNS structural elements. I. Glutamate and related amino acids. *Neurochemical Research* **14** (6): 555-62.

Barbaccia, M.L., Concas, A., Serra, M. and Biggio, G. (1998). Stress and neurosteroids in adult and aged rats. *Experimental Gerontology* **33** (7-8): 697-712.

Barbara, L., Barbiroli, B., Gaiani, S., Bolondi, L., Sofia, S., Zironi, G. and Lodi, R. (1993). Abnormal brain energy metabolism assessed by ^{31}P -NMR in liver cirrhosis. *Hepato-Gastroenterology* **40** 6/O (abstract).

Barker, J.L., Harrison, N.L., Meyers, D.E. and Majewska, M.D. (1986). Steroid modulation of GABAA receptor-coupled Cl^- conductance. *Clinical Neuropharmacology* **4** (392): 392-4.

Bates, T.E., Williams, S.R., Kauppinen, R.A. and 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. *Journal of Neurochemistry* **53** (1): 102-10.

Battaini, F., Elkabes, S., Bergamaschi, S., Ladisa, V., Lucchi, L., De, G.P.,

Schuurman, T., Wetsel, W.C., *et al.* (1995). Protein kinase C activity, translocation, and conventional isoforms in aging rat brain. *Neurobiology of Aging* **16** (2): 137-48.

Baulieu, E.E. (1998). Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* **23** (8): 963-87.

Bazan, N.G. (1989). Arachidonic acid in the modulation of excitable membrane function and at the onset of brain damage. *Annals of the New York Academy of Sciences* **559** (1): 1-16.

Beaubernard, C., Salomon, F. and Bismuth, H. (1980). Encéphalopathie hépatique expérimentale: étude de l'organisation d'un échantillon du sommeil diurne chez le rat avec anastomose porto-cave. *Biomedicine* **32** (2): 76-80.

Benavides, J., Capdeville, C., Dauphin, F., Dubois, A., Duverger, D., Fage, D., Gotti, B., MacKenzie, E.T., *et al.* (1990). The quantification of brain lesions with an omega 3 site ligand: a critical analysis of animal models of cerebral ischaemia and neurodegeneration. *Brain Research* **522** (2): 275-89.

Bender, A.S. and Hertz, L. (1987). Pharmacological characteristics of diazepam receptors in neurons and astrocytes in primary cultures. *Journal of Neuroscience Research* **18** (2): 366-72.

Bender, A.S. and Norenberg, M.D. (1996). Effects of ammonia on L-glutamate uptake in cultured astrocytes. *Neurochemical Research* **21** (5): 567-73.

Benkovic, S.A. and Connor, J.R. (1993). Ferritin, transferrin, and iron in selected regions of the adult and aged rat brain. *Journal of Comparative Neurology* **338** (1): 97-113.

Bergonzi, P., Bianco, A., Mazza, S. and Mennuni, G. (1978). Night sleep organization in patients with severe hepatic failure. Its modifications after L-dopa treatment. *European Neurology* **17** (5): 271-5.

Bessman, S.P. and Bessman, A.N. (1955). The cerebral and peripheral uptake

of ammonia in liver disease with hypothesis for the mechanism of hepatic coma. *Journal of Clinical Investigation* **34** 622-8.

Billard, J.M., Jouvenceau, A., Lamour, Y. and Dutar, P. (1997). NMDA receptor activation in the aged rat: electrophysiological investigations in the CA1 area of the hippocampal slice ex vivo. *Neurobiology of Aging* **18** (5): 535-42.

Bismuth, H., Benhamou, J.-P. and Lataste, P. (1963). L'anastomose porto-cave expérimentale chez le rat normal: techniques et résultats préliminaires. *Presse Médicale* **71** 1859-61.

Bjørnas, M., Gjesdal, O., Erickson, J.D., Torp, R., Levy, L.M., Ottersen, O.P., Degree, M., J., S.M., *et al.* (1996). Cloning and expression of a neuronal rat brain glutamate transporter. *Brain Research. Molecular Brain Research* **36** (1): 163-8.

Bjørklund, H., M., E.N., Dahl, D., Rose, G., Hoffer, B. and Olson, L. (1985). Image analysis of GFA-positive astrocytes from adolescence to senescence. *Experimental Brain Research* **58** (1): 163-70.

Blakemore, A.H. (1955). The surgical treatment of cirrhosis of the liver. *J. Chron. Dis.* **2** 70-75.

Blei, A.T., Omary, R. and Butterworth, R.F. (1992). Animal models of hepatic encephalopathies. In: *Animal Models of Neurological Disease, II.*, A. Boulton, G. Baker and R.F. Butterworth (Ed.) The Humana Press Inc. 183-222.

Bliss, T.V. and Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361** (6407): 31-9.

Boogerd, W., Zoetmulder, F.A. and Moffie, D. (1990). Hyperammonemic encephalopathy due to suture line breakdown after bladder operation. *Clinical Neurology & Neurosurgery* **92** (3): 255-7.

Bradford, H.F., Ward, H.K. and Thomas, A.J. (1978). Glutamine: a major substrate for nerve endings. *Journal of Neurochemistry* **30** (6): 1453-9.

Bronson, R.T., Lipman, R.D. and Harrison, D.E. (1993). Age-related gliosis in the white matter of mice. *Brain Research* **609** (1-2): 124-8.

Brookes, N. (1992a). Effect of intracellular glutamine on the uptake of large neutral amino acids in astrocytes: concentrative Na⁽⁺⁾-independent transport exhibits metastability. *Journal of Neurochemistry* **59** (1): 227-35.

Brookes, N. (1992b). Regulation of the glutamine content of astrocytes by cAMP and hydrocortisone: effect of pH. *Neuroscience Letters* **147** (2): 139-42.

Brumback, R.A. and Lapham, M.D. (1989). DNA synthesis in Alzheimer type II astrocytosis : The question of astrocytic proliferation and mitosis in experimentally induced hepatic encephalopathy. *Archives in Neurology* **46** :845-8.

Bruton, C.J., Corsellis, J.A. and Russell, A. (1970). Hereditary hyperammonaemia. *Brain* **93** (2): 423-34.

Burnett, D.M., Daniell, L.C. and Zahniser, N.R. (1990). Decreased efficacy of inositol 1,4,5-trisphosphate to elicit calcium mobilization from cerebrocortical microsomes of aged rats. *Molecular Pharmacology* **37** (4): 566-71.

Butterworth, R.F. (1992). Evidence that hepatic encephalopathy results from a defect of glutamatergic synaptic regulation. *Molecular Neuropharmacology* **2** 229-232.

Butterworth, R.F. (2000). Complications of cirrhosis III. Hepatic encephalopathy. *Journal of Hepatology* **32** (1 Suppl) : 171-80.

Butterworth, R.F. and Giguère, J.F. (1984). Region-selective glutamine changes in the CNS in relation to function in experimental subacute hepatic encephalopathy. In: *Advances in Hepatic Encephalopathy and Urea Cycle Disease.*, G. Kleinberger, P. Ferenci, P. Riederer and H. Thaler (Ed.) Basel, Karger. 394-401.

- Butterworth, R.F., Giguère, J.F., Michaud, J., Lavoie, J. and Pomier Layrargues, G. (1987). Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochemical Pathology* **6** (1-2): 1-12.
- Butterworth, R.F., Girard, G. and Giguère, J.F. (1988). Regional differences in the capacity for ammonia removal by brain following portocaval anastomosis. *Journal of Neurochemistry* **51** (2): 486-90.
- Butterworth, R.F., Le, O., Lavoie, J. and Szerb, J.C. (1991). Effect of portacaval anastomosis on electrically stimulated release of glutamate from rat hippocampal slices. *Journal of Neurochemistry* **56** (5): 1481-4.
- Butterworth, R.F., Spahr, L., Fontaine, S. and Pomier Layrargues, G. (1995). Manganese toxicity, dopaminergic dysfunction and hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease* **10** (4): 259-67.
- Butterworth, R.F., Tonon, M.C., Desy, L., Giguère, J.F., Vaudry, H. and Pelletier, G. (1991). Increased brain content of the endogenous benzodiazepine receptor ligand, octadecaneuropeptide (ODN), following portacaval anastomosis in the rat. *Peptides* **12** (1): 119-25.
- Cabrera, J., Maynar, M., Granados, R., Gorriz, E., Reyes, R., Pulido-Duque, J.M., Rodriguez SanRoman, J.L., Guerra, C., *et al.* (1996). Transjugular intrahepatic portosystemic shunt versus sclerotherapy in the elective treatment of variceal hemorrhage. *Gastroenterology* **110** (3): 832-9.
- Cameron, G.R. and Hasan, S.M. (1958). Disturbances of structure and function in the liver as the result of biliary obstruction. *Journal of Pathology and Bacteriology* **75** 333-349.
- Cameron, G.R. and Oakley, C.L. (1932). Ligation of the common bile duct. *Journal of Pathology and Bacteriology* **35** 769-98.
- Campbell, A.G., Rosenberg, L.E., Snodgrass, P.J. and Nuzum, C.T. (1973). Ornithine transcarbamylase deficiency: a cause of lethal neonatal hyperammonemia in males. *New England Journal of Medicine* **288** (1): 1-6.

- Cao-Danh, H., Strolin-Benedetti, M. and Dostert, P. (1985). Age-related changes in glutamine synthetase activity of rat brain, liver and heart. *Gerontology* **31** (2): 95-100.
- Cavanagh, J.B., Blakemore, W.F. and Kyu, M.H. (1971). Fibrillary accumulations in oligodendroglial processes of rats subjected to portocaval anastomosis. *Journal of the Neurological Sciences* **14** (2): 143-52.
- Cavanagh, J.B. and Kyu, M.H. (1971). Type II Alzheimer change experimentally produced in astrocytes in the rat. *Journal of the Neurological Sciences* **12** (1): 63-75.
- Cavanagh, J.B., Lewis, P.D., Blakemore, W.F. and Kyu, M.H. (1972). Changes in the cerebellar cortex in rats after portocaval anastomosis. *Journal of the Neurological Sciences* **15** (1): 13-26.
- Chamuleau, R.A.F.M., Bosman, D.K., Bovée, W.M.M.J., Luyten, P.R. and Barkhof, F. (1991). Chronic hepatic encephalopathy studied by NMR spectroscopy and MRI in man. *Journal of Hepatology* **13** (suppl 2) S19.
- Chan, H., Hazell, A.S., Desjardins, P. and Butterworth, R.F. (2000). Effects of ammonia on glutamate transporter (GLAST) protein and mRNA in cultured rat cortical astrocytes. *Neurochemistry International* **37** (2-3): 243-8.
- Choi, J.H. and Yu, B.P. (1995). Brain synaptosomal aging: free radicals and membrane fluidity. *Free Radical Biology & Medicine* **18** (2): 133-9.
- Cobo, M., Exposito, I., Porras, A. and Mora, F. (1992). Release of amino acid neurotransmitters in different cortical areas of conscious adult and aged rats. *Neurobiology of Aging* **13** (6): 705-9.
- Cole, M., Rutherford, R.B. and Smith, F.O. (1972). Experimental ammonia encephalopathy in the primate. *Archives of Neurology* **26** (2): 130-6.
- Conn, H.O. (1979). *The Hepatic Coma Syndromes and Lactulose*. Baltimore,

Williams & Wilkins.

Conti, F. and Weinberg, R.J. (1999). Shaping excitation at glutamatergic synapses. *Trends in Neurosciences* **22** (10): 451-8.

Cooper, A.J. and Lai, J.C. (1987). Cerebral ammonia metabolism in normal and hyperammonemic rats. *Neurochemical Pathology* **6** (1-2): 67-95.

Cooper, A.J., McDonald, J.M., Gelbard, A.S., Gledhill, R.F. and Duffy, T.E. (1979). The metabolic fate of ^{13}N -labeled ammonia in rat brain. *Journal of Biological Chemistry* **254** (12): 4982-92.

Cooper, A.J., Mora, S.N., Cruz, N.F. and Gelbard, A.S. (1985). Cerebral ammonia metabolism in hyperammonemic rats. *Journal of Neurochemistry* **44** (6): 1716-23.

Cooper, A.J. and Plum, F. (1987). Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiological Reviews* **67** (2): 440-519.

Cooper, A.J.L. and Gelbard, A.S. (1988). Metabolism of [^{13}N] ammonia in normal and hyperammonemic rat brain. In: *Advances in ammonia metabolism and hepatic encephalopathy.*, P.B. Soeter, J.H.P. Wilson, A.J. Mejer and E. Holm (Ed.) New York, Elsevier Science Publisher. 420-32.

Cooper, J.L. (1996). Role of the liver in amino acid metabolism. In: *Hepatology.*, D. Zakim and T.D. Boyer (Ed.) Philadelphia, W.B. Saunders Company. Third Edition, 563-601.

Córdoba, J., Cabrera, J., Lataif, L., Penev, P., Zee, P. and Blei, A.T. (1998). High prevalence of sleep disturbance in cirrhosis. *Hepatology* **27** (2): 339-45.

Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S. and Smith, S.J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* **247** (4941): 470-3.

Coy, D.L., Mehta, R., Zee, P., Salchli, F., Turek, F.W. and Blei, A.T. (1992).

Portal-systemic shunting and the disruption of circadian locomotor activity in the rat. *Gastroenterology* **103** (1): 222-8.

Coy, D.L., Srivastava, A., Gottstein, J., Butterworth, R.F. and Blei, A.T. (1991). Postoperative course after portacaval anastomosis in rats is determined by the portacaval pressure gradient. *American Journal of Physiology* **24** G1072-G1078.

Cruz, N.F. and Diemel, G.A. (1994). Brain glucose levels in portacaval-shunted rats with chronic, moderate hyperammonemia: implications for determination of local cerebral glucose utilization. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **14** (1): 113-24.

Cruz, N.F. and Duffy, T.E. (1983). Local cerebral glucose metabolism in rats with chronic portacaval shunts. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **3** (3): 311-20.

Dalezios, Y. and Matsokis, N. (1998). Brain benzodiazepine binding in aged rats. *Neurochemistry International* **32** (2): 213-7.

Dam, M., Burra, P., Tedeschi, U., Cagnin, A., Chierichetti, F., Ermani, M., Ferlin, G., Naccarato, R., *et al.* (1998). Regional cerebral blood flow changes in patients with cirrhosis assessed with ^{99m}Tc-HM-PAO single-photon emission computed tomography: effect of liver transplantation. *Journal of Hepatology* **29** (1): 78-84.

Danbolt, N.C., Storm, M.J. and Kanner, B.I. (1992). An [Na⁺ + K⁺]coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. *Neuroscience* **51** (2): 295-310.

Dawson, R.J., Wallace, D.R. and Meldrum, M.J. (1989). Endogenous glutamate release from frontal cortex of adult and aged rats. *Neurobiology of Aging* **10** (6): 665-8.

Dejong, C.H., Deutz, N.E. and Soeters, P.B. (1993a). Cerebral cortex ammonia and glutamine metabolism in two rat models of chronic liver insufficiency-

induced hyperammonemia: influence of pair-feeding. *Journal of Neurochemistry* **60** (3): 1047-57.

Dejong, C.H., Deutz, N.E. and Soeters, P.B. (1993b). Metabolic adaptation of the kidney to hyperammonemia during chronic liver insufficiency in the rat. *Hepatology* **18** (4): 890-902.

Dejong, C.H., Deutz, N.E. and Soeters, P.B. (1993c). Renal ammonia and glutamine metabolism during liver insufficiency-induced hyperammonemia in the rat. *Journal of Clinical Investigation* **92** (6): 2834-40.

Dejong, C.H., Deutz, N.E. and Soeters, P.B. (1996). Ammonia and glutamine metabolism during liver insufficiency: the role of kidney and brain in interorgan nitrogen exchange. *Scandinavian Journal of Gastroenterology Supplement* **218** (61): 61-77.

Dejong, C.H., Kampman, M.T., Deutz, N.E. and Soeters, P.B. (1992). Cerebral cortex ammonia and glutamine metabolism during liver insufficiency-induced hyperammonemia in the rat. *Journal of Neurochemistry* **59** (3): 1071-9.

Demirgoren, S., Majewska, M.D., Spivak, C.E. and London, E.D. (1991). Receptor binding and electrophysiological effects of dehydroepiandrosterone sulfate, an antagonist of the GABAA receptor. *Neuroscience* **45** (1): 127-35.

Desjardins, P., Bandeira, P., Raghavendra, R.V., Ledoux, S. and Butterworth, R.F. (1997). Increased expression of the peripheral-type benzodiazepine receptor-isoquinoline carboxamide binding protein mRNA in brain following portacaval anastomosis. *Brain Research* **758** (1-2): 255-8.

Desjardins, P., Bandeira, P., Rao, V.L. and Butterworth, R.F. (1999). Portacaval anastomosis causes selective alterations of peripheral-type benzodiazepine receptor expression in rat brain and peripheral tissues. *Neurochemistry International* **35** (4): 293-9.

Desole, M.S., Esposito, G., Migheli, R., Fresu, L., Sircana, S., Zangani, D., Miele, M. and Miele, E. (1995). Cellular defence mechanisms in the striatum of

- young and aged rats subchronically exposed to manganese. *Neuropharmacology* **34** (3): 289-95.
- Deutz, N.E., Chamuleau, R.A., de Graaf, A., Bovee, W.M. and de Beer, R. (1988). In vivo ^{31}P NMR spectroscopy of the rat cerebral cortex during acute hepatic encephalopathy. *Nmr in Biomedicine* **1** (2): 101-6.
- Diemer, N.H., Klee, J., Schroder, H. and Klinken, L. (1977). Glial and nerve cell changes in rats with porto-caval anastomosis. *Acta Neuropathologica* **39** (1): 59-68.
- Diemer, N.H. and Tonnesen, K. (1977). Glial changes in pigs with porto-caval anastomosis and temporary or total hepatic artery clamping. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section A, Pathology* **85** (5): 721-30.
- Dingledine, R. and McBain, C.J. (1999). Glutamate and Aspartate. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.*, G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers and P.B. Molinoff (Ed.) Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers. 6th Ed., 315-333.
- Drejer, J., Larsson, O.M. and Schousboe, A. (1982). Characterization of L-glutamate uptake into and release from astrocytes and neurons cultured from different brain regions. *Experimental Brain Research* **47** (2): 259-69.
- Duffy, T.E., Plum, F. and Cooper, A.J.L. (1983). In: *Glutamine, Glutamate, and GABA in the Central Nervous System.*, L. Hertz, E. Kvamme, E.G. McGeer and A. Schousboe (Ed.) New York, Alan R. Liss. 371-88.
- Eck, N.V. (1953). Eck's fistula. *Surg. Gynecol. Obstet.* **96** 375-6.
- Ehlers, M.D., Zhang, S., Bernhardt, J.P. and Huganir, R.L. (1996). Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell* **84** (5): 745-55.
- Ehrlich, M., Plum, F. and Duffy, T.E. (1980). Blood and brain ammonia concentrations after portacaval anastomosis. Effects of acute ammonia

loading. *Journal of Neurochemistry* **34** (6): 1538-42.

Eklof, B., Holmin, T., Johannsson, H. and Siesjo, B.K. (1974). Cerebral blood flow and cerebral metabolic rate for oxygen in rats with porta-caval anastomosis. *Acta Physiologica Scandinavica* **90** (2): 337-44.

Erecinska, M., Pastuszko, A., Wilson, D.F. and Nelson, D. (1987). Ammonia-induced release of neurotransmitters from rat brain synaptosomes: differences between the effects on amines and amino acids. *Journal of Neurochemistry* **49** (4): 1258-65.

Erecinska, M. and Silver, I.A. (1990). Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Progress in Neurobiology* **35** (4): 245-96.

Fairman, W.A., Vandenberg, R.J., Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P. and Amara, S.G. (1995). An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* **375** (6532): 599-603.

Fan, P., Lavoie, J., Le, N.L., Szerb, J.C. and 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** (2): 327-34.

Fazekas, J.F., Ticktin, H.E., Ehrmantraut, W.R. and Alman, R.W. (1956). Cerebral metabolism in hepatic insufficiency. *American Journal of Medicine* **21** 843-9.

Ferenci, P. (1991). Hepatic encephalopathy. In : Oxford Textbook of Clinical Hepatology, Vol 1, Oxford University Press, Oxford, 473-83

Figiel, M. and Engele, J. (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), a neuron-derived peptide regulating glial glutamate transport and metabolism. *Journal of Neuroscience* **20** (10): 3596-605.

Finch, C.E. (1993). Neuron atrophy during aging: programmed or sporadic? *Trends in Neurosciences* **16** (3): 104-10.

Finch, C.E. and Roth, G.S. (1999). Biochemistry of Aging. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.*, G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers and P.B. Molinoff (Ed.) Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers. 6th Ed., 613-633.

Fiore, L. and Rampello, L. (1989). L-acetylcarnitine attenuates the age-dependent decrease of NMDA-sensitive glutamate receptors in rat hippocampus. *Acta Neurologica* **11** (5): 346-50.

Fitzpatrick, S.M., Behar, K.L. and Shulman, R.G. (1988). In vivo . NMR spectroscopy studies of cerebral metabolism in rats after porta-caval shunting. In: *Hepatic Encephalopathy: Physiology and Treatment.*, R.F. Butterworth and G. Pommier-Layrargue (Ed.) Clifton, NJ, Humana. 177-187.

Fonnum, F. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *Journal of Neurochemistry* **42** (1): 1-11.

Franco, D., Gigou, M., Szekely, A.M. and Bismuth, H. (1979). Portal hypertension after bile duct obstruction: effect of bile diversion on portal pressure in the rat. *Archives of Surgery* **114** (9): 1064-7.

Freeman, G.B. and Gibson, G.E. (1987). Selective alteration of mouse brain neurotransmitter release with age. *Neurobiology of Aging* **8** (2): 147-52.

Friedman, E. and Wang, H.Y. (1989). Effect of age on brain cortical protein kinase C and its mediation of 5-hydroxytryptamine release. *Journal of Neurochemistry* **52** (1): 187-92.

Gaiti, A. (1989). The aging brain. A normal phenomenon with not-so-normal arachidonic acid metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences* **559** (365): 365-73.

Galiegue, S., Jbilo, O., Combes, T., Bribes, E., Carayon, P., Le Fur, G. and Casellas, P. (1999). Cloning and characterization of PRAX-1. A new protein that specifically interacts with the peripheral benzodiazepine receptor. *Journal*

of Biological Chemistry **274** (5): 2938-52.

Gallo, V. and Russell, J.T. (1995). Excitatory amino acid receptors in glia: different subtypes for distinct functions? *Journal of Neuroscience Research* **42** (1): 1-8.

Ganda, O.P. and Ruderman, N.B. (1976). Muscle nitrogen metabolism in chronic hepatic insufficiency. *Metabolism: Clinical & Experimental* **25** (4): 427-35.

Garnier, M., Dimchev, A.B., Boujrad, N., Price, J.M., Musto, N.A. and Papadopoulos, V. (1994). In vitro reconstitution of a functional peripheral-type benzodiazepine receptor from mouse Leydig tumor cells. *Molecular Pharmacology* **45** (2): 201-11.

Gegelashvili, G., Civenni, G., Racagni, G., Danbolt, N.C., Schousboe, I. and Schousboe, A. (1996). Glutamate receptor agonists up-regulate glutamate transporter GLAST in astrocytes. *Neuroreport* **8** (1): 261-5.

Gegelashvili, G. and Schousboe, A. (1997). High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Molecular Pharmacology* **52** (1): 6-15.

Gegelashvili, G. and Schousboe, A. (1998). Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Research Bulletin* **45** (3): 233-8.

Gemba, T., Oshima, T. and Ninomiya, M. (1994). Glutamate efflux via the reversal of the sodium-dependent glutamate transporter caused by glycolytic inhibition in rat cultured astrocytes. *Neuroscience* **63** (3): 789-95.

Giaume, C. and McCarthy, K.D. (1996). Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends in Neurosciences* **19** (8): 319-25.

Giguère, J.F. and Butterworth, R.F. (1984). Amino acid changes in regions of

Neuronal-glia differential processing of DBI to yield ligands to central or peripheral benzodiazepine recognition sites. In: *Imidazopyridines in sleep disorders.*, P. Sauvenet, S.Z. Langer and P.L. Morselli (Ed.) New York, Raven Press. 25-38.

Guidotti, A., Forchetti, C.M., Corda, M.G., Konkel, D., Bennett, C.D. and Costa, E. (1983). Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80** (11): 3531-5.

Gutierrez, J.A. and Norenberg, M.D. (1975). Alzheimer II astrocytosis following methionine sulfoximine. *Archives of Neurology* **32** (2): 123-6.

Gutierrez, J.A. and Norenberg, M.D. (1977). Ultrastructural study of methionine sulfoximine-induced Alzheimer type II astrocytosis. *American Journal of Pathology* **86** (2): 285-300.

Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry* **59** (5): 1609-23.

Hamberger, A., Hedquist, B., Lundborg, H. and Nystrom, B. (1980). Hippocampal glutamate release after porta cava anastomosis: reduced sensitivity to ammonia inhibition. *Journal of Neuroscience Research* **5** (4): 313-22.

Hamberger, A., Hedquist, B. and Nystrom, B. (1979). Ammonium ion inhibition of evoked release of endogenous glutamate from hippocampal slices. *Journal of Neurochemistry* **33** (6): 1295-302.

Hamberger, A.C., Chiang, G.H., Nysten, E.S., Scheff, S.W. and Cotman, C.W. (1979). Glutamate as a CNS transmitter. I. Evaluation of glucose and glutamine as precursors for the synthesis of preferentially released glutamate. *Brain Research* **168** (3): 513-30.

Hansen, L.A., Armstrong, D.M. and Terry, R.D. (1987). An

the CNS in relation to function in experimental portal-systemic encephalopathy. *Neurochemical Research* **9** (9): 1309-21.

Giguère, J.F., Hamel, E. and Butterworth, R.F. (1992). Increased densities of binding sites for the 'peripheral-type' benzodiazepine receptor ligand [³H]PK 11195 in rat brain following portacaval anastomosis. *Brain Research* **585** (1-2): 295-8.

Gilad, G.M., Gilad, V.H. and Tizabi, Y. (1990). Aging and stress-induced changes in choline and glutamate uptake in hippocampus and septum of two rat strains differing in longevity and reactivity to stressors. *International Journal of Developmental Neuroscience* **8** (6): 709-13.

Girard, G. and Butterworth, R.F. (1992). Effect of portacaval anastomosis on glutamine synthetase activities in liver, brain, and skeletal muscle. *Digestive Diseases & Sciences* **37** (7): 1121-6.

Girard, G., Giguère, J.F. and Butterworth, R.F. (1993). Region-selective reductions in activities of glutamine synthetase in rat brain following portacaval anastomosis. *Metabolic Brain Disease* **8** (4): 207-15.

Gjedde, A., Lockwood, A.H., Duffy, T.E. and Plum, F. (1978). Cerebral blood flow and metabolism in chronically hyperammonemic rats: effect of an acute ammonia challenge. *Annals of Neurology* **3** (4): 325-30.

Gregorios, J.B., Mozes, L.W., Norenberg, L.O. and Norenberg, M.D. (1985). Morphologic effects of ammonia on primary astrocyte cultures. II. Electron microscopic studies. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **44** (4): 404-414.

Guarneri, P., Papadopoulos, V., Pan, B. and Costa, E. (1992). Regulation of pregnenolone synthesis in C6-2B glioma cells by 4'-chlorodiazepam. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89** (11): 5118-22.

Guidotti, A., Berkkovich, A., Ferrarese, C., Santi, M.R. and Costa, E. (1988).

- immunohistochemical quantification of fibrous astrocytes in the aging human cerebral cortex. *Neurobiology of Aging* **8** (1): 1-6.
- Hansson, E., Johansson, B.B., Westergren, I. and Ronnback, L. (1994). Glutamate-induced swelling of single astroglial cells in primary culture. *Neuroscience* **63** (4): 1057-66.
- Harman, D. (1996). Aging and disease: extending functional life span. *Annals of the New York Academy of Sciences* **786** (321): 321-36.
- Hauser, R.A., Zesiewicz, T.A., Rosemurgy, A.S., Martinez, C. and Olanow, C.W. (1994). Manganese intoxication and chronic liver failure. *Annals of Neurology* **36** (6): 871-5.
- Häussinger, D., Sies, H. and Gerok, W. (1984). Functional hepatocyte heterogeneity in ammonia metabolism. The intracellular glutamine cycle. *Journal of Hepatology* **1** 3.
- Häussinger, D., Steeb, R., Kaiser, S., Wettstein, M., Stoll, B. and Gerok, W. (1990). Nitrogen metabolism in normal and cirrhotic liver. *Advances in Experimental Medicine & Biology* **272** (47): 47-64.
- Hawkins, R.A. and Mans, A.M. (1989). Brain energy metabolism in hepatic encephalopathy. In: *Hepatic encephalopathy: pathophysiology and treatment.*, R.F. Butterworth and G. Pomier-Layrargues (Ed.) Clifton, N.J., Humana Press. 159-76.
- Hawkins, R.A., Mans, A.M., Davis, D.W., Vina, J.R. and Hibbard, L.S. (1985). Cerebral glucose use measured with [¹⁴C]glucose labeled in the 1, 2, or 6 position. *American Journal of Physiology* **248** (1 pt 1) : C170-6
- Hazell, A.S. and Butterworth, R.F. (1999). Hepatic encephalopathy: An update of pathophysiologic mechanisms. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine* **222** (2): 99-112.
- Hazell, A.S., Desjardins, P. and Butterworth, R.F. (1999a). Chronic exposure of

rat primary astrocyte cultures to manganese results in increased binding sites for the 'peripheral-type' benzodiazepine receptor ligand ^3H PK 11195. *Neuroscience Letters* **271** (1): 5-8.

Hazell, A.S., Desjardins, P. and Butterworth, R.F. (1999b). Increased expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cultured astrocytes following exposure to manganese. *Neurochemistry International* **35** (1): 11-7.

Hazell, A.S. and Norenberg, M.D. (1997). Manganese decreases glutamate uptake in cultured astrocytes. *Neurochemical Research* **22** (12): 1443-7.

Hecker, M., Mulsch, A. and Busse, R. (1994). Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase. *Journal of Neurochemistry* **62** (4): 1524-9.

Heeneman, S., Dejong, C.H. and Deutz, N.E. (1994). Effects of methionine sulphoximine treatment on renal amino acid and ammonia metabolism in rats. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* **427** (5-6): 524-32.

Herndon, J.G., Constantinidis, I. and Moss, M.B. (1998). Age-related brain changes in rhesus monkeys: a magnetic resonance spectroscopic study. *Neuroreport* **9** (9): 2127-30.

Hertz, L. (1979). Functional interactions between neurons and astrocytes I. Turnover and metabolism of putative amino acid transmitters. *Progress in Neurobiology* **13** (3): 277-323.

Herz, R., Sautter, V., Robert, F. and Bircher, J. (1972). The Eck fistula rat: definition of an experimental model. *European Journal of Clinical Investigation* **2** (6): 390-7.

Hexum, T.D. and Fried, R. (1979). Effects of superoxide radicals on transport (Na + K) adenosine triphosphatase and protection by superoxide dismutase. *Neurochemical Research* **4** (1): 73-82.

- Hindfelt, B., Plum, F. and Duffy, T.E. (1977). Effect of acute ammonia intoxication on cerebral metabolism in rats with portocaval shunts. *Journal of Clinical Investigation* **59** 386-96.
- Huie, R.E. and Padmaja, S. (1993). The reaction of NO with superoxide. *Free Radical Research Communications* **18** (4): 195-9.
- Inoue, E., Hori, S., Narumi, Y., Fujita, M., Kuriyama, K., Kadota, T. and Kuroda, C. (1991). Portal-systemic encephalopathy: presence of basal ganglia lesions with high signal intensity on MR images. *Radiology* **179** (2): 551-5.
- Insausti, R., Insausti, A.M., Sobreviela, M.T., Salinas, A. and Martinez, P.J. (1998). Human medial temporal lobe in aging: anatomical basis of memory preservation. *Microscopy Research & Technique* **43** (1): 8-15.
- Itzhak, Y., Baker, L. and Norenberg, M.D. (1993). Characterization of the peripheral-type benzodiazepine receptors in cultured astrocytes: evidence for multiplicity. *Glia* **9** (3): 211-8.
- Itzhak, Y. and Norenberg, M.D. (1994). Ammonia-induced upregulation of peripheral-type benzodiazepine receptors in cultured astrocytes labeled with [³H]PK 11195. *Neuroscience Letters* **177** (1-2): 35-8.
- Itzhak, Y., Roig, C.A., Dombro, R.S. and Norenberg, M.D. (1995). Acute liver failure and hyperammonemia increase peripheral-type benzodiazepine receptor binding and pregnenolone synthesis in mouse brain. *Brain Research* **705** (1-2): 345-8.
- Jasek, M.C. and Griffith, W.H. (1998). Pharmacological characterization of ionotropic excitatory amino acid receptors in young and aged rat basal forebrain. *Neuroscience* **82** (4): 1179-94.
- Jellinger, K.A. (1993). Morphology of the aging brain. In: *Advances in Research on Neurodegeneration.*, D.B. Calne, R. Horowski, Y. Mizuno et al. (Ed.) Boston, Birkhauser. 107-37.

Johnson, S.J. and Finch, C.E. (1996). Changes in gene expression during brain aging: A survey. In: *Handbook of the Biology of Aging.*, E.L. Schneider and J.W. Rowe (Ed.) San Diego, Academic Press. 3rd, 300-327.

Johnstone, J.M. and Lee, E.G. (1976). A quantitative assessment of the structural changes the rat's liver following obstruction of the common bile duct. *British Journal of Experimental Pathology* **57** (1): 85-94.

Joseph-Liauzun, E., Farges, R., Delmas, P., Ferrara, P. and Loison, G. (1997). The Mr 18,000 subunit of the peripheral-type benzodiazepine receptor exhibits both benzodiazepine and isoquinoline carboxamide binding sites in the absence of the voltage-dependent anion channel or of the adenine nucleotide carrier. *Journal of Biological Chemistry* **272** (44): 28102-6.

Jouveneau, A., Dutar, P. and Billard, J.M. (1997). Is activation of the metabotropic glutamate receptors impaired in the hippocampal CA1 area of the aged rat? *Hippocampus* **7** (5): 455-9.

Jung-Testas, I., Hu, Z.Y., Baulieu, E.E. and Robel, P. (1989). Steroid synthesis in rat brain cell cultures. *Journal of Steroid Biochemistry* **34** (1-6): 511-9.

Kanai, Y., Stelzner, M., Nussberger, S., Khawaja, S., Hebert, S.C., Smith, C.P. and Hediger, M.A. (1994). The neuronal and epithelial human high affinity glutamate transporter. Insights into structure and mechanism of transport. *Journal of Biological Chemistry* **269** (32): 20599-606.

Kardel, T. (1974). Liver function, age, and portasystemic encephalopathy. *Netherlands Journal of Medicine* **17** (2): 50-3.

Kessler, M., Baudry, M. and Lynch, G. (1989). Quinoxaline derivatives are high-affinity antagonists of the NMDA receptor-associated glycine sites. *Brain Research* **489** (2): 377-82.

Kirzinger, S.S. and Fonda, M.L. (1978). Glutamine and ammonia metabolism in the brains of senescent mice. *Experimental Gerontology* **13** (3-4): 255-61.

Kito, S., Miyoshi, R. and Nomoto, T. (1990). Influence of age on NMDA receptor complex in rat brain studied by in vitro autoradiography. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **38** (12): 1725-31.

Knecht, K., Michalak, A., Rose, C., Rothstein, J.D. and Butterworth, R.F. (1997). Decreased glutamate transporter (GLT-1) expression in frontal cortex of rats with acute liver failure. *Neuroscience Letters* **229** (3): 201-3.

Komiskey, H.L. and MacFarlan, M.F. (1983). Effect on neuronal and non-neuronal benzodiazepine binding sites. *Neurochemical Research* **8** (9): 1135-41.

Kornhuber, M.E., Kornhuber, J., Retz, W. and Riederer, P. (1993). L-glutamate and L-aspartate concentrations in the developing and aging human putamen tissue. *Journal of Neural Transmission - General Section* **93** (2): 145-50.

Kramer, L., Tribl, B., Gendo, A., Zauner, C., Schneider, B., Ferenci, P. and Madl, C. (2000). Partial pressure of ammonia versus ammonia in hepatic encephalopathy. *Hepatology* **31** (1): 30-4.

Kreis, R., Farrow, N. and Ross, B.D. (1991). Localized ^1H NMR spectroscopy in patients with chronic hepatic encephalopathy. Analysis of changes in cerebral glutamine, choline and inositols. *NMR in Biomedicine* **4** (2): 109-16.

Kreis, R., Ross, B.D., Farrow, N.A. and Ackerman, Z. (1992). Metabolic disorders of the brain in chronic hepatic encephalopathy detected with ^1H -MR spectroscopy. *Radiology* **182** (1): 19-27.

Krieger, D., Krieger, S., Jansen, O., Gass, P., Theilmann, L. and Lichtnecker, H. (1995). Manganese and chronic hepatic encephalopathy. *Lancet* **346** (8970): 270-4.

Kril, J.J., Flowers, D. and Butterworth, R.F. (1997). Distinctive pattern of Bergmann glial pathology in human hepatic encephalopathy. *Molecular & Chemical Neuropathology* **31** (3): 279-87.

Krueger, K.E. and Papadopoulos, V. (1990). Peripheral-type benzodiazepine receptors mediate translocation of cholesterol from outer to inner mitochondrial membranes in adrenocortical cells. *Journal of Biological Chemistry* **265** (25): 15015-22.

Krueger, K.E. and Papadopoulos, V. (1992). Mitochondrial benzodiazepine receptors and the regulation of steroid biosynthesis. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology* **32** (211): 211-37.

Kuehl Kovarik, M.C., Magnusson, K.R., Premkumar, L.S. and Partin, K.M. (2000). Electrophysiological analysis of NMDA receptor subunit changes in the aging mouse cortex. *Mechanisms of Ageing & Development* **115** (1-2): 39-59.

Kulisevsky, J., Pujol, J., Balanzo, J., Junque, C., Deus, J., Capdevilla, A. and Villanueva, C. (1992). Pallidal hyperintensity on magnetic resonance imaging in cirrhotic patients: clinical correlations. *Hepatology* **16** (6): 1382-8.

Kurtz, D., Zenglein, J.P., Imler, M., Girardel, M., Grinspan, G., Peter, B. and Rohmer, F. (1972). Étude du sommeil nocturne au cours de l'encéphalopathie porto-cave. *Électroencéphalographie Clinique et Neurophysiologie* **33** 167.

Kvamme, E. and Lenda, K. (1982). Regulation of glutaminase by exogenous glutamate, ammonia and 2-oxoglutarate in synaptosomal enriched preparation from rat brain. *Neurochemical Research* **7** (6): 667-78.

Kyu, M.H. and Cavanagh, J.B. (1970). Some effects of porto-caval anastomosis in the male rat. *British Journal of Experimental Pathology* **51** (2): 217-27.

Laake, J.H., Slyngstad, T.A., Haug, F.M. and Ottersen, O.P. (1995). Glutamine from glial cells is essential for the maintenance of the nerve terminal pool of glutamate: immunogold evidence from hippocampal slice cultures. *Journal of Neurochemistry* **65** (2): 871-81.

Lai, J.C. and Cooper, A.J. (1986). Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *Journal of Neurochemistry* **47** (5): 1376-86.

- Lambert, J.J., Belelli, D., Hill Venning, C. and Peters, J.A. (1995). Neurosteroids and GABAA receptor function. *Trends in Pharmacological Sciences* **16** (9): 295-303.
- Landfield, P.W., Waymire, J.C. and Lynch, G. (1978). Hippocampal aging and adrenocorticoids: quantitative correlations. *Science* **202** (4372): 1098-102.
- Lantin, N., Tangapregassom, M.J., Salomon, F., Grange, D. and Bismuth, H. (1979). Brain amino acids changes during hepatic encephalopathy in the rat with portocaval anastomosis. *Journal of Neurochemistry* **32** (6): 1871-4.
- Laping, N.J., Teter, B., Anderson, C.P., Osterburg, H.H., O'Callaghan, J.P., Johnson, S.A. and Finch, C.E. (1994). Age-related increases in glial fibrillary acidic protein do not show proportionate changes in transcription rates or DNA methylation in the cerebral cortex and hippocampus of male rats. *Journal of Neuroscience Research* **39** (6): 710-7.
- Lavoie, J., Giguère, J.F., Pomier Layrargues, G. and Butterworth, R.F. (1987a). Activities of neuronal and astrocytic marker enzymes in autopsied brain tissue from patients with hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease* **2** (4): 283-90.
- Lavoie, J., Giguère, J.F., Pomier Layrargues, G. and Butterworth, R.F. (1987b). Amino acid changes in autopsied brain tissue from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Journal of Neurochemistry* **49** (3): 692-7.
- Lavoie, J., Pomier Layrargues, G. and Butterworth, R.F. (1990). Increased densities of "peripheral-type" benzodiazepine receptors in brain autopsy samples from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Hepatology* **11** (5): 874-8.
- Lee, S.H. and Fisher, B. (1961). Portocaval shunt in the rat. *Surgery* **50** 668-72.
- Lehre, K.P., Levy, L.M., Ottersen, O.P., Storm, M.J. and Danbolt, N.C. (1995).

Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *Journal of Neuroscience* **15** (3 pt 1): 1835-53

Leong, D.K., Therrien, G., Swain, M.S. and Butterworth, R.F. (1994). Densities of binding sites for the "peripheral-type" benzodiazepine receptor ligand ³H-PK11195 are increased in brain 24 hours following portacaval anastomosis. *Metabolic Brain Disease* **9** (3): 267-73.

Lester, H.A., Cao, Y. and Mager, S. (1996). Listening to neurotransmitter transporters. *Neuron* **17** (5): 807-10.

Levy, L.M., Lehre, K.P., Rolstad, B. and Danbolt, N.C. (1993). A monoclonal antibody raised against an [Na⁺]+K⁺] coupled L-glutamate transporter purified from rat brain confirms glial cell localization. *FEBS Letters* **317** (1-2): 79-84.

Lewis, P.D. and Miller, A.L. (1970). Argininosuccinic aciduria. Case report with neuropathological findings. *Brain* **93** (2): 413-22.

Lockwood, A.H., Ginsberg, M.D., Butler, C.M. and Gutierrez, M.T. (1982). Selective effects of ammonia on regional brain glucose metabolism. *Annals of Neurology* **12** :114-25.

Lockwood, A.H., Ginsberg, M.D., Rhoades, H.M. and Gutierrez, M.T. (1986). Cerebral glucose metabolism after portacaval shunting in the rat. Patterns of metabolism and implications for the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Journal of Clinical Investigation* **78** (1): 86-95.

Lockwood, A.H., McDonald, J.M., Reiman, R.E., Gelbard, A.S., Laughlin, J.S., Duffy, T.E. and Plum, F. (1979). The dynamics of ammonia metabolism in man. Effects of liver disease and hyperammonemia. *Journal of Clinical Investigation* **63** (3): 449-60.

Lapham, L.W. (1962). Cytologic and cytochemical studies of neuroglia. 1. A study of the problem of amitosis in reactive protoplasmic astrocytes. *American Journal of Pathology* **41** : 1-21

- Lockwood, A.H., Murphy, B.W., Donnelly, K.Z., Mahl, T.C. and Perini, S. (1993). Positron-emission tomographic localization of abnormalities of brain metabolism in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology* **18** (5): 1061-8.
- Lockwood, A.H., Yap, E.W., Rhoades, H.M. and Wong, W.H. (1991a). Altered cerebral blood flow and glucose metabolism in patients with liver disease and minimal encephalopathy. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **11** (2): 331-6.
- Lockwood, A.H., Yap, E.W. and Wong, W.H. (1991b). Cerebral ammonia metabolism in patients with severe liver disease and minimal hepatic encephalopathy [published erratum appears in J Cereb Blood Flow Metab 1992 Jan;12(1):177]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **11** (2): 337-41.
- Lombardi, G., Mannaioni, G., Leonardi, P., Cherici, G., Carla, V. and Moroni, F. (1994). Ammonium acetate inhibits ionotropic receptors and differentially affects metabotropic receptors for glutamate. *Journal of Neural Transmission General Section* **97** (3): 187-96.
- Lowry, O.H. and Passonneau, J.V. (1966). Kinetic evidence for multiple binding sites on phosphofructokinase. *Journal of Biological Chemistry* **241** :2268-79.
- Lynch, M.A. (1998). Analysis of the mechanisms underlying the age-related impairment in long-term potentiation in the rat. *Reviews in the Neurosciences* **9** (3): 169-201.
- Ma, X.Y., Su, Y.B., Zhang, F.R. and Li, J.F. (1996). Effects of vitamin E on the blastogenic response of splenocytes and lipofuscin contents in the hearts and brains of aged mice. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology & Oncology* **15** (1): 51-3.
- Maddison, J.E., Mickelthwaite, C., Watson, W.E. and Johnston, G.A. (1996). Synaptosomal and brain slice cerebrocortical [³H]L-glutamate uptake in a rat

model of chronic hepatic encephalopathy. *Neurochemistry International* **28** (1): 89-93.

Maddison, J.E., Watson, W.E., Dodd, P.R. and Johnston, G.A. (1991). Alterations in cortical [³H]kainate and alpha-[³H]amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid binding in a spontaneous canine model of chronic hepatic encephalopathy. *Journal of Neurochemistry* **56** (6): 1881-8.

Maddison, J.E., Watson, W.E. and Johnston, G.A. (1992). CNQX binding to non-NMDA glutamate receptors in canine cerebro-cortical crude synaptosomal membranes: pharmacological characterization and comparison of binding parameters in dogs with congenital portosystemic encephalopathy and control dogs. *Metabolic Brain Disease* **7** (1): 35-44.

Maddison, J.E., Watson, W.E.J. and Johnston, G.A.R. (1991). Cerebellar [³H]Kainate and [³H]AMPA binding in dogs with congenital portosystemic encephalopathy. *Neurochemistry International* **19** (4): 511-515.

Magnusson, K.R. (1995). Differential effects of aging on binding sites of the activated NMDA receptor complex in mice. *Mechanisms of Ageing & Development* **84** (3): 227-43.

Magnusson, K.R. (1997). Influence of dietary restriction on ionotropic glutamate receptors during aging in C57B1 mice. *Mechanisms of Ageing & Development* **95** (3): 187-202.

Magnusson, K.R. (2000). Declines in mRNA expression of different subunits may account for differential effects of aging on agonist and antagonist binding to the NMDA receptor. *Journal of Neuroscience* **20** (5): 1666-74.

Magnusson, K.R. and Cotman, C.W. (1993a). Age-related changes in excitatory amino acid receptors in two mouse strains. *Neurobiology of Aging* **14** (3): 197-206.

Magnusson, K.R. and Cotman, C.W. (1993b). Effects of aging on NMDA and MK801 binding sites in mice. *Brain Research* **604** (1-2): 334-7.

Majewska, M.D. (1992). Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Progress in Neurobiology* **38** (4): 379-95.

Mandybur, T.I., Ormsby, I. and Zemlan, F.P. (1989). Cerebral aging: a quantitative study of gliosis in old nude mice. *Acta Neuropathologica* **77** (5): 507-13.

Mans, A.M., Biebuyck, J.F., Davis, D.W., Bryan, R.M. and Hawkins, R.A. (1983). Regional cerebral glucose utilization in rats with portacaval anastomosis. *Journal of Neurochemistry* **40** (4): 986-91.

Mans, A.M., Davis, D.W., Biebuyck, J.F. and Hawkins, R.A. (1986). Failure of glucose and branched-chain amino acids to normalize brain glucose use in portacaval shunted rats. *Journal of Neurochemistry* **47** (5): 1434-43.

Marcaida, G., Miñana, M.D., Burgal, M., Grisolfá, S. and Felipo, V. (1995). Ammonia prevents activation of NMDA receptors by glutamate in rat cerebellar neuronal cultures. *European Journal of Neuroscience* **7** (12): 2389-96.

Mariani, P., Coudray-Lucas, C., Baudrimont, M., Ribeiro, J., Legendre, C., Delelo, R., Cynober, L., Balladur, P., *et al.* (1996). Glutamine metabolism and neuropathological disorders in experimental hepatic encephalopathy: effect of transplanted hepatocytes. *Surgery* **120** (1): 93-9.

Martin, H., Voss, K., Hufnagl, P., Wack, R. and Wassilew, G. (1987). Morphometric and densitometric investigations of protoplasmic astrocytes and neurons in human hepatic encephalopathy. *Experimental Pathology* **32** (4): 241-50.

Martin, J.J. and Schlote, W. (1972). Central nervous system lesions in disorders of amino-acid metabolism. A neuropathological study. *Journal of the Neurological Sciences* **15** (1): 49-76.

Martin, J.R., Baettig, K. and Bircher, J. (1980). Maze patrolling, open-field

- behavior and runway activity following experimental portacaval anastomosis in rats. *Physiology & Behavior* **25** (5): 713-9.
- Martinez, M., Hernanz, A., Ferrandiz, M.L., De, J.E., Sevilla, I., Martinez, N. and Miquel, J. (1995). Glucose deprivation increases aspartic acid release from synaptosomes of aged mice. *Brain Research* **673** (1): 149-52.
- Martinez-Hernandez, A., Bell, K.P. and Norenberg, M.D. (1977). Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* **195** (4284): 1356-8.
- Martini, A., Battaini, F., Govoni, S. and Volpe, P. (1994). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and ryanodine receptor in the aging brain of Wistar rats. *Neurobiology of Aging* **15** (2): 203-6.
- Massieu, L. and Tapia, R. (1997). Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats in vivo. *Journal of Neurochemistry* **69** (3): 1151-60.
- Matheson, D.F. and Van den Berg, C.J. (1975). Ammonia and brain glutamine: inhibition of glutamine degradation by ammonia. *Biochemical Society Transactions* **3** (4): 525-8.
- Matsumoto, H., Kikuchi, S. and Ito, M. (1982). Age-related changes in the glutamate metabolism of cerebral cortical slices from rats. *Neurochemical Research* **7** (6): 679-85.
- McCann, S.M. (1997). The nitric oxide hypothesis of brain aging. *Experimental Gerontology* **32** (4-5): 431-40.
- McCann, S.M., Licinio, J., Wong, M.L., Yu, W.H., Karanth, S. and Rettorri, V. (1998). The nitric oxide hypothesis of aging. *Experimental Gerontology* **33** (7-8): 813-26.
- McDermott, W.V. and Adams, R.D. (1954). Episodic stupor associated with an Eck fistula in the human with particular reference to the metabolism of ammonia. *Journal of Clinical Investigation* **33** 1-9.

McEnery, M.W., Snowman, A.M., Trifiletti, R.R. and Snyder, S.H. (1992). Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89** (8): 3170-4.

McGahon, B. and Lynch, M.A. (1996). The synergism between ACPD and arachidonic acid on glutamate release in hippocampus is age-dependent. *European Journal of Pharmacology* **309** (3): 323-6.

McKenna, M.C., Sonnewald, U., Huang, X., Stevenson, J. and Zielke, H.R. (1996). Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *Journal of Neurochemistry* **66** (1): 386-93.

Mena, E.E. and Cotman, C.W. (1985). Pathologic concentrations of ammonium ions block L-glutamate uptake. *Experimental Neurology* **89** (1): 259-63.

Mendenhall, C.L., Rouster, S., and Marshall, L. (1986). A new therapy for portal systemic encephalopathy. *American Journal of Gastroenterology* **81** : 540-43

Miller, R.J. (1998). Mitochondria - the Kraken wakes:. *Trends in Neurosciences* **21** (3): 95-7.

Miller, S., Cotman, C.W. and Bridges, R.J. (1992). 1-Aminocyclopentane-trans-1,3-dicarboxylic acid induces glutamine synthetase activity in cultured astrocytes. *Journal of Neurochemistry* **58** (5): 1967-70.

Miñana, M.D., Felipo, V. and Grisolia, S. (1988). Protective effect of long term ammonium ingestion against acute ammonium intoxication. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **153** (3): 979-83.

Mitchell, J.J. and Anderson, K.J. (1998). Age-related changes in [³H]MK-801 binding in the Fischer 344 rat brain. *Neurobiology of Aging* **19** (3): 259-65.

Miyoshi, R., Kito, S., Doudou, N. and Nomoto, T. (1990). Age-related changes

of strychnine-insensitive glycine receptors in rat brain as studied by in vitro autoradiography. *Synapse* **6** (4): 338-43.

Miyoshi, R., Kito, S., Doudou, N. and Nomoto, T. (1991). Influence of age on N-methyl-D-aspartate antagonist binding sites in the rat brain studied by in vitro autoradiography. *Synapse* **8** (3): 212-7.

Monmaur, P., Beaubernard, C., Salomon, F., Grange, D., Thangapregassam, M.J. and Bismuth, H. (1976). Encéphalopathie hépatique expérimentale: I.- Modifications de la durée des différents états de sommeil diurne chez le rat avec anastomose porto-cave. *Biologie et Gastro Enterologie* **9** (2): 99-103.

Moore, W.A., Davey, V.A., Weindruch, R., Walford, R. and Ivy, G.O. (1995). The effect of caloric restriction on lipofuscin accumulation in mouse brain with age. *Gerontology* **2** (173): 173-85.

Morgan, T.E., Rozovsky, I., Goldsmith, S.K., Stone, D.J., Yoshida, T. and Finch, C.E. (1997). Increased transcription of the astrocyte gene GFAP during middle-age is attenuated by food restriction: implications for the role of oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* **23** (3): 524-8.

Moroni, F., Lombardi, G., Moneti, G. and Cortesini, C. (1983). The release and neosynthesis of glutamic acid are increased in experimental models of hepatic encephalopathy. *Journal of Neurochemistry* **40** (3): 850-4.

Mrak, R.E., Griffin, S.T. and Graham, D.I. (1997). Aging-associated changes in human brain. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **56** (12): 1269-75.

Mukhin, A.G., Papadopoulos, V., Costa, E. and Krueger, K.E. (1989). Mitochondrial benzodiazepine receptors regulate steroid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86** (24): 9813-6.

Mullany, P., Connolly, S. and Lynch, M.A. (1996). Ageing is associated with changes in glutamate release, protein tyrosine kinase and Ca²⁺/calmodulin-

dependent protein kinase II in rat hippocampus. *European Journal of Pharmacology* **309** (3): 311-5.

Murphy, S., Simmons, M.L., Agullo, L., Garcia, A., Feinstein, D.L., Galea, E., Reis, D.J., Minc Golomb, D., *et al.* (1993). Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends in Neurosciences* **16** (8): 323-8.

Najlerahim, A., Francis, P.T. and Bowen, D.M. (1990). Age-related alteration in excitatory amino acid neurotransmission in rat brain. *Neurobiology of Aging* **11** (2): 155-8.

Nedergaard, M. (1994). Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* **263** (5154): 1768-71.

Nelson, K., Golnick, J., Korn, T. and Angle, C. (1993). Manganese encephalopathy: utility of early magnetic resonance imaging. *British Journal of Industrial Medicine* **50** (6): 510-3.

Newland, M.C., Ceckler, T.L., Kordower, J.H. and Weiss, B. (1989). Visualizing manganese in the primate basal ganglia with magnetic resonance imaging. *Experimental Neurology* **106** (3): 251-8.

Nicolle, M.M., Bizon, J.L. and Gallagher, M. (1996). In vitro autoradiography of ionotropic glutamate receptors in hippocampus and striatum of aged Long-Evans rats: relationship to spatial learning. *Neuroscience* **74** (3): 741-56.

Nicolle, M.M., Colombo, P.J., Gallagher, M. and McKinney, M. (1999). Metabotropic glutamate receptor-mediated hippocampal phosphoinositide turnover is blunted in spatial learning-impaired aged rats. *Journal of Neuroscience* **19** (21): 9604-10.

Nieto, C., Arias, J., Alasua, A. and Garcia de Jalon, P.D. (1980). Changes in brain oxidative metabolism in rats with portocaval shunt. *Experientia* **36** (12): 1403-4.

Norenberg, M.D. (1977). A light and electron microscopic study of experimental

portal-systemic (ammonia) encephalopathy. Progression and reversal of the disorder. *Laboratory Investigation* **36** (6): 618-27.

Norenberg, M.D. (1981) The astrocyte in liver disease. In :Advances in Cellular Neurobiology. Volume 2 . Academic Press, London, 303-52

Norenberg, M.D. (1990). Astrocytes in hepatic encephalopathy. *Advances in Experimental Medicine & Biology* **272** (81): 81-97.

Norenberg, M.D., Huo, Z., Neary, J.T. and Roig Cantesano, A. (1997). The glial glutamate transporter in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: relation to energy metabolism and glutamatergic neurotransmission. *Glia* **21** (1): 124-33.

Norenberg, M.D. and Lapham, L.W. (1974). The astrocyte response in experimental portal-systemic encephalopathy: an electron microscopic study. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **33** (3): 422-35.

Norenberg, M.D., Lapham, L.W., Nichols, F.A. and May, A.G. (1974). An experimental model for the study of hepatic encephalopathy. *Archives in Neurology* **31** 106.

Norenberg, M.D., Neary, J.T., Norenberg, L.O. and McCarthy, M. (1990). Ammonia induced decrease in glial fibrillary acidic protein in cultured astrocytes. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **49** (4): 399-405.

Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A. and Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* **307** (5950): 462-5.

O'Carroll, R.E., Hayes, P.C., Ebmeier, K.P., Dougall, N., Murray, C., Best, J.J., Bouchier, I.A. and Goodwin, G.M. (1991). Regional cerebral blood flow and cognitive function in patients with chronic liver disease. *Lancet* **337** (8752): 1250-3.

Ong, J.P., Sands, M. and Younossi, Z.M. (2000). Transjugular intrahepatic portosystemic shunts (TIPS): a decade later. *Journal of Clinical Gastroenterology* **30** (1): 14-28.

Oppong, K.N., Bartlett, K., Record, C.O. and al, M.H. (1995). Synaptosomal glutamate transport in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. *Hepatology* **22** (2): 553-8.

Ottersen, O.P., Langmoem, I.A. and Gjerstad, L. (1998). Progress in Brain Research: The Glutamate Synapse as a Therapeutic Target. New York, Elsevier.

Packman, S., Mahoney, M.J., Tanaka, K. and Hsia, Y.E. (1978). Severe hyperammonemia in a newborn infant with methylmalonyl-CoA mutase deficiency. *Journal of Pediatrics* **92** (5): 769-71.

Palmer, A.M., Robichaud, P.J. and Reiter, C.T. (1994). The release and uptake of excitatory amino acids in rat brain: effect of aging and oxidative stress. *Neurobiology of Aging* **15** (1): 103-11.

Papadopoulos, V., Berkovich, A., Krueger, K.E., Costa, E. and Guidotti, A. (1991). Diazepam binding inhibitor and its processing products stimulate mitochondrial steroid biosynthesis via an interaction with mitochondrial benzodiazepine receptors. *Endocrinology* **129** (3): 1481-8.

Papadopoulos, V. and Brown, A.S. (1995). Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **53** (1-6): 103-10.

Papadopoulos, V., Guarneri, P., Kreuger, K.E., Guidotti, A. and Costa, E. (1992). Pregnenolone biosynthesis in C6-2B glioma cell mitochondria: regulation by a mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89** (11): 5113-7.

Papadopoulos, V., Mukhin, A.G., Costa, E. and Krueger, K.E. (1990). The peripheral-type benzodiazepine receptor is functionally linked to Leydig cell steroidogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **265** (7): 3772-9.

Papadopoulos, V., Kapsis, A., Li, H., Amri, H., Hardwick, M., Culty, M., Kasprzyk, P.G., Carlson, M., Moreau, J.P. and Drieu, K. (2000) Drug-induced inhibition of the peripheral-type benzodiazepine receptor expression and cell proliferation in human breast cancer cells. *Anticancer Research* **20** (5A): 2835-47

Papavasiliou, P.S., Miller, S.T. and Cotzias, G.C. (1966). Role of liver in regulating distribution and excretion of manganese. *American Journal of Physiology* **211** (1): 211-6.

Patel, A.J., Hunt, A. and Faraji, S.F. (1986). Effect of removal of glutamine and addition of dexamethasone on the activities of glutamine synthetase, ornithine decarboxylase and lactate dehydrogenase in primary cultures of forebrain and cerebellar astrocytes. *Brain Research* **391** (2): 229-38.

Peinado, M.A. (1998). Histology and histochemistry of the aging cerebral cortex: an overview. *Microscopy Research & Technique* **43** (1): 1-7.

Peng, L.A., Schousboe, A. and Hertz, L. (1991). Utilization of alpha-ketoglutarate as a precursor for transmitter glutamate in cultured cerebellar granule cells. *Neurochemical Research* **16** (1): 29-34.

Pentschew, A. (1964). Contribution of experimental manganese encephalopathy to neurology and neuropathology. *Revista de Neuro Psiquiatria* **27** (4): 405-13.

Peterson, C. and Cotman, C.W. (1989). Strain-dependent decrease in glutamate binding to the N-methyl-D-aspartic acid receptor during aging. *Neuroscience Letters* **104** (3): 309-13.

Peterson, C., Giguère, J.F., Cotman, C.W. and Butterworth, R.F. (1990). Selective loss of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[³H]glutamate binding sites

in rat brain following portacaval anastomosis. *Journal of Neurochemistry* **55** (2): 386-90.

Pfefferbaum, A., Adalsteinsson, E., Spielman, D., Sullivan, E.V. and Lim, K.O. (1999). In vivo spectroscopic quantification of the N-acetyl moiety, creatine, and choline from large volumes of brain gray and white matter: effects of normal aging. *Magnetic Resonance in Medicine* **41** (2): 276-84.

Piani, D., Frei, K., Pfister, H.W. and Fontana, A. (1993). Glutamate uptake by astrocytes is inhibited by reactive oxygen intermediates but not by other macrophage-derived molecules including cytokines, leukotrienes or platelet-activating factor. *Journal of Neuroimmunology* **48** (1): 99-104.

Pilbeam, C.M., Anderson, R.M. and Bhathal, P.S. (1983). The brain in experimental portal-systemic encephalopathy. I. Morphological changes in three animal models. *Journal of Pathology* **140** (4): 331-45.

Pomier Layrargues, G., Rose, C., Spahr, L., Zayed, J., Normandin, L. and Butterworth, R.F. (1998). Role of manganese in the pathogenesis of portal-systemic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease* **13** (4): 311-7.

Pomier Layrargues, G., Spahr, L. and Butterworth, R.F. (1995). Increased manganese concentrations in pallidum of cirrhotic patients. *Lancet* **345** (8951):

Posner, J.B. and Plum, F. (1960). The toxic effects of carbon dioxide and acetazolamide in hepatic encephalopathy. *Journal of Clinical Investigation* **39** 1246-58.

Price, M.T., Olney, J.W. and Haft, R. (1981). Age-related changes in glutamate concentration and synaptosomal glutamate uptake in adult rat striatum. *Life Sciences* **28** (12): 1365-70.

Proctor, E. and Chatamra, K. (1984). Standardized micronodular cirrhosis in the rat. *European Surgical Research* **16** (3): 182-6.

- Quero, J.C. and Schalm, S.W. (1996). Subclinical hepatic encephalopathy. *Seminars in Liver Disease* **16** 321-8.
- Raabe, W. and Onstad, G. (1985). Porta-caval shunting changes neuronal sensitivity to ammonia. *Journal of the Neurological Sciences* **71** (2-3): 307-14.
- Raabe, W.A. (1989). Neurophysiology of ammonia intoxication. In: *Hepatic Encephalopathy: Pathophysiology and Treatment.*, R.B. Butterworth and G. Pommier Layrargues (Ed.) Clifton, NJ, Humana Press. 49-77.
- Raichle, M.E. and 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. *Circulation Research* **48** 913-37.
- Rajeswari, T.S. and Radha, E. (1984). Metabolism of the glutamate group of amino acids in rat brain as a function of age. *Mechanisms of Ageing & Development* **24** (2): 139-49.
- Rao, V.L., Audet, R.M. and 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. *Journal of Neurochemistry* **65** (3): 1221-8.
- Rao, V.L., Audet, R.M. and Butterworth, R.F. (1995). Increased nitric oxide synthase activities and L- ^3H Aginine uptake in brain following portacaval anastomosis. *Journal of Neurochemistry* **65** (2):677-81
- Rao, V.L., Audet, R.M., Therrien, G. and Butterworth, R.F. (1994). Tissue-specific alterations of binding sites for peripheral-type benzodiazepine receptor ligand ^3H PK11195 in rats following portacaval anastomosis. *Digestive Diseases & Sciences* **39** (5): 1055-63.
- Rao, V.L., Murthy, C.R. and Butterworth, R.F. (1992). Glutamatergic synaptic dysfunction in hyperammonemic syndromes. *Metabolic Brain Disease* **7** (1): 1-20.

Rao, V.L., Qureshi, I.A. and Butterworth, R.F. (1993). Increased densities of binding sites for the peripheral-type benzodiazepine receptor ligand [³H]PK 11195 in congenital ornithine transcarbamylase-deficient sparse fur mouse. *Pediatric Research* **34** (6): 777-80.

Rasmussen, T., Schliemann, T., Sorensen, J.C., Zimmer, J. and West, M.J. (1996). Memory impaired aged rats: no loss of principal hippocampal and subicular neurons. *Neurobiology of Aging* **17** (1): 143-7.

Read, A.E., Laidlaw, J. and Sherlock, S. (1961). Neuropsychiatric complications of portacaval anastomosis. *Lancet* **1** 1961.

Ribeiro, J., Nordlinger, B., Ballet, F., Cynober, L., Coudray, L.C., Baudrimont, M., Legendre, C., Delelo, R., *et al.* (1992). Intrasplenic hepatocellular transplantation corrects hepatic encephalopathy in portacaval-shunted rats. *Hepatology* **15** (1): 12-8.

Rizzuto, N. and Gonatas, N.K. (1974). Ultrastructural study of effect of methionine sulfoximine on developing and adult rat cerebral cortex. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **33** (2): 237-50.

Rodriguez, G., Testa, R., Celle, G., Gris, A., Marengo, S., Nobili, F., Novellone, G. and Rosadini, G. (1987). Reduction of cerebral blood flow in subclinical hepatic encephalopathy and its correlation with plasma-free tryptophan. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **7** (6): 768-72.

Rose, C., Butterworth, R.F., Zayed, J., Normandin, L., Todd, K., Michalak, A., Spahr, L., Huet, P.M., *et al.* (1999). Manganese deposition in basal ganglia structures results from both portal-systemic shunting and liver dysfunction. *Gastroenterology* **117** (3): 640-4.

Ross, B.D., Kreis, R., Geissler, A., Ernst, T. and Shonk, T. (1995). Clinical experience with proton magnetic resonance spectroscopy in chronic (and sub-clinical) hepatic encephalopathy. In: *Advances in hepatic encephalopathy and metabolic nitrogen exchange.*, L. Capocaccia, M. Merli and O. Riggio (Ed.) Boca Raton, CRC Press. 349-56.

Ross, B.D., Morgan, M.Y., Cox, I.J., Hawley, K.E. and Young, I.R. (1987). Continuing defect in cerebral energy metabolism in patients with persistent encephalopathy (PHE): monitoring with ^{31}P -MRS. *Clinical Sciences*. **72 (Suppl 16)**: 26P.

Rössle, M., Haag, K., Ochs, A., Sellinger, M., Noldge, G., Perarnau, J.M., Berger, E., Blum, U., *et al.* (1994). The transjugular intrahepatic portosystemic stent-shunt procedure for variceal bleeding. *New England Journal of Medicine* **330** (3): 165-71.

Rothstein, J.D., Dykes Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., *et al.* (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* **16** (3): 675-86.

Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., M., D.H., Jin, L., Wu, D., Nash, N. and Kuncl, R.W. (1994). Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* **13** (3): 713-25.

Rothstein, J.D., McKhann, G., Guarneri, P., Barbaccia, M.L., Guidotti, A. and Costa, E. (1989). Cerebrospinal fluid content of diazepam binding inhibitor in chronic hepatic encephalopathy. *Annals of Neurology* **26** (1): 57-62.

Sanger, N., Strohmeier R., Kaufmann, M. and Kuhl, H. (2000) Cell cycle-related expression and ligand binding of peripheral benzodiazepine receptor in human breast cancer cell lines. *European Journal of Cancer* **36** (16): 2157-63

Sanyal, A.J., Freedman, A.M., Shiffman, M.L., Purdum, P.3., Luketic, V.A. and Cheatham, A.K. (1994). Portosystemic encephalopathy after transjugular intrahepatic portosystemic shunt: results of a prospective controlled study. *Hepatology* **20** 46-55.

Schipper, H.M. (1991). Gomori-positive astrocytes: biological properties and implications for neurologic and neuroendocrine disorders. *Glia* **4** (4): 365-77.

Schlag, B.D., Vondrasek, J.R., Munir, M., Kalandadze, A., Zeleniaia, O.A., Rothstein, J.D. and Robinson, M.B. (1998). Regulation of the glial Na⁺-dependent glutamate transporters by cyclic AMP analogs and neurons. *Molecular Pharmacology* **53** (3): 355-69.

Schmidt, W., Wolf, G., Grüngreiff, K. and Linke, K. (1993). Adenosine influences the high-affinity uptake of transmitter glutamate and aspartate under conditions of hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease* **8** (2): 73-80.

Schmidt, W., Wolf, G., Grüngreiff, K., Meier, M. and Reum, T. (1990). Hepatic encephalopathy influences high-affinity uptake of transmitter glutamate and aspartate into the hippocampal formation. *Metabolic Brain Disease* **5** (1): 19-31.

Schousboe, A. (1981). Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons and glial cells. *International Review of Neurobiology* **22** (1): 1-45.

Schousboe, A. and Divac, I. (1979). Difference in glutamate uptake in astrocytes cultured from different brain regions. *Brain Research* **177** (2): 407-9.

Schuff, N., Amend, D.L., Knowlton, R., Norman, D., Fein, G. and Weiner, M.W. (1999). Age-related metabolite changes and volume loss in the hippocampus by magnetic resonance spectroscopy and imaging. *Neurobiology of Aging* **20** (3): 279-85.

Semon, B.A., Leung, P.M. and Rogers, Q.R. (1988). Effect of pre-feeding ammonium acetate on food intake of rats fed high protein diets. *Physiology & Behavior* **42** (5): 471-6.

Semon, B.A., Leung, P.M., Rogers, Q.R. and Gietzen, D.W. (1989). Plasma and brain ammonia and amino acids in rats measured after feeding 75% casein or 28% egg white. *Journal of Nutrition* **119** (11): 1583-92.

Shank, R.P., Leo, G.C. and Zielke, H.R. (1993). Cerebral metabolic

compartmentation as revealed by nuclear magnetic resonance analysis of D-[1-¹³C]glucose metabolism. *Journal of Neurochemistry* **61** (1): 315-23.

Sherlock, S. (1958). Pathogenesis and management of hepatic coma. *American Journal of Medicine* **24** 805.

Shimada, A., Mukhin, A., Ingram, D.K. and London, E.D. (1997). N-methyl-D-aspartate receptor binding in brains of rats at different ages. *Neurobiology of Aging* **18** (3): 329-33.

Siegerstetter, V. and Rossle, M. (1997). The role of TIPS for the treatment of portal hypertension: effects and efficacy. *Acta Gastroenterologica Belgica* **60** (3): 233-7.

Slobodyansky, E., Antkiewicz-Michaluk, L. and Martin, B. (1994). Purification of a novel DBI processing product, DBI39-75, and characterization of its binding site in rat brain. *Regulatory Peptides* **50** (1): 29-35.

Smith, C.B., Goochee, C., Rapoport, S.I. and Sokoloff, L. (1980). Effects of ageing on local rates of cerebral glucose utilization in the rat. *Brain* **103** (2): 351-65.

Sobel, R.A., DeArmond, S.J., Forno, L.S. and Eng, L.F. (1981). Glial fibrillary acidic protein in hepatic encephalopathy. An immunohistochemical study. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **40** (6): 625-32.

Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., Mh, D.R., Patlak, C.S., Pettigrew, K.D., Sakurada, O. and Shinohara, M. (1977). The [¹⁴C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *Journal of Neurochemistry* **28** (5): 897-916.

Soong, N.W., Dang, M.H., Hinton, D.R. and Arnheim, N. (1996). Mitochondrial DNA deletions are rare in the free radical-rich retinal environment. *Neurobiology of Aging* **17** (6): 827-31.

Spahr, L., Butterworth, R.F., Fontaine, S., Bui, L., Therrien, G., Milette, P.C., Lebrun, L.H., Zayed, J., *et al.* (1996). Increased blood manganese in cirrhotic patients: relationship to pallidal magnetic resonance signal hyperintensity and neurological symptoms. *Hepatology* **24** (5): 1116-20.

Strolin-Benedetti, M., Kettler, R., Marrari, P., Cini, M., Da Prada, M. and Dostert, P. (1990). The effects of lifelong treatment with MAO inhibitors on amino acid levels in rat brain. *Journal of Neural Transmission Parkinsons Disease & Dementia Section* **2** (4): 239-48.

Stubel, H. (1911). Die Fluoreszenz tierscher Gewebe in ultravioletten Licht. *Pfluegers Arch. Gesamte Physiol.* **142** 1-14.

Suárez, I., Bodega, G., Arilla, E., Rubio, M., Villalba, R. and Fernández, B. (1992). Different response of astrocytes and Bergmann glial cells to portacaval shunt: an immunohistochemical study in the rat cerebellum. *Glia* **6** (3): 172-9.

Suárez, I., Bodega, G. and Fernández, B. (1997). Modulation of AMPA receptor subunits GluR1 and GluR2/3 in the rat cerebellum in an experimental hepatic encephalopathy model. *Brain Research* **778** (2): 346-53.

Suárez, I., Bodega, G. and Fernández, B. (2000). Modulation of glutamate transporters (GLAST, GLT-1 and EAAC1) in the rat cerebellum following portocaval anastomosis. *Brain Research* **859** (2): 293-302.

Sun, A.Y., Yang, W.L. and Kim, H.D. (1993). Free radical and lipid peroxidation in manganese-induced neuronal cell injury. *Annals of the New York Academy of Sciences* **679** (358): 358-63.

Suzuki, H., Hayakawa, S. and Wada, S. (1989). Effect of age on the modification of brain polyunsaturated fatty acids and enzyme activities by fish oil diet in rats. *Mechanisms of Ageing & Development* **50** (1): 17-25.

Swain, M.S., Blei, A.T., Butterworth, R.F. and Kraig, R.P. (1991). Intracellular pH rises and astrocytes swell after portacaval anastomosis in rats. *American Journal of Physiology* **261** R1491-R1496.

Swanson, R.A., Yu, A.C., Chan, P.H. and Sharp, F.R. (1990). Glutamate increases glycogen content and reduces glucose utilization in primary astrocyte culture. *Journal of Neurochemistry* **54** (2): 490-6.

Szabó, C. (1996). Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. *Brain Research Bulletin* **41** (3): 131-41.

Szerb, J.C. and Butterworth, R.F. (1992). Effect of ammonium ions on synaptic transmission in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology* **39** (2): 135-53.

Takahashi, T., Forsythe, I.D., Tsujimoto, T., Barnes, D.M. and Onodera, K. (1996). Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor. *Science* **274** (5287): 594-7.

Takeda, T., Kimura, M., Yokoi, K. and Itokawa, Y. (1996). Effect of age and dietary protein level on tissue mineral levels in female rats. *Biological Trace Element Research* **54** (1): 55-74.

Taketani, S., Kohno, H., Furukawa, T. and Tokunaga, R. (1995). Involvement of peripheral-type benzodiazepine receptors in the intracellular transport of heme and porphyrins. *Journal of Biochemistry* **117** (4): 875-80.

Tamaru, M., Yoneda, Y., Ogita, K., Shimizu, J. and Nagata, Y. (1991). Age-related decreases of the N-methyl-D-aspartate receptor complex in the rat cerebral cortex and hippocampus. *Brain Research* **542** (1): 83-90.

Tarkkanen, L., Laitinen, L. and Johansson, G. (1974). Effects of d-tubocurarine on intracranial pressure and thalamic electrical impedance. *Anesthesiology* **40** (3): 247-51.

Taylor, P., Schoene, W.C., Reid, W.A.J. and von Lichtenberg, F. (1979). Quantitative changes in astrocytes after portacaval shunting in chimpanzees and in man with normal liver parenchyma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* **103** (2): 82-5.

Taylor-Robinson, S.D., Sargentoni, J., Mallalieu, R.J., Bell, J.D., Bryant, D.J., Coutts, G.A. and Morgan, M.Y. (1994a). Cerebral phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy in patients with chronic hepatic encephalopathy. *Hepatology* **20** (5): 1173-8.

Taylor-Robinson, S.D., Sargentoni, J., Marcus, C.D., Morgan, M.Y. and Bryant, D.J. (1994b). Regional variations in cerebral proton spectroscopy in patients with chronic hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease* **9** (4): 347-59.

Therrien, G. and Butterworth, R.F. (1991). Cerebrospinal fluid amino acids in relation to neurological status in experimental portal-systemic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease* **6** (2): 65-74.

Therrien, G., Giguère, J.F. and Butterworth, R.F. (1991). Increased cerebrospinal fluid lactate reflects deterioration of neurological status in experimental portal-systemic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease* **6** (4): 225-31.

Therrien, G., Rose, C. and Butterworth, R.F. (1995). Early loss of day-night rhythms following portocaval anastomosis in the rat. In: *Advances in hepatic encephalopathy and nitrogen exchange.*, L. Capocaccia, M. Merli and O. Riggio (Ed.) Boca Raton, CRC press Inc. 304-307.

Torp, R., Danbolt, N.C., Babaie, E., Bjoras, M., Seeberg, E., Storm, M.J. and Ottersen, O.P. (1994). Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: an in situ hybridization study. *European Journal of Neuroscience* **6** (6): 936-42.

Tossman, U., Delin, A., Eriksson, L.S. and Ungerstedt, U. (1987). Brain cortical amino acids measured by intracerebral dialysis in portacaval shunted rats. *Neurochemical Research* **12** (3): 265-9.

Trams, E.G. and Symeonidis, A. (1983). Morphologic and functional changes in the liver of rats after ligation or excision of the common bile duct. *American Journal of Pathology* **33** 13-27.

Traynelis, S.F., Hartley, M. and Heinemann, S.F. (1995). Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science* **268** (5212): 873-6.

Tricklebank, M.D., Smart, J.L., Bloxam, D.L. and Curzon, G. (1978). Effects of chronic experimental liver dysfunction and L-tryptophan on behaviour in the rat. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* **9** (2): 181-9.

Trotti, D., Rossi, D., Gjesdal, O., Levy, L.M., Racagni, G., Danbolt, N.C. and Volterra, A. (1996). Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. *Journal of Biological Chemistry* **271** (11): 5976-9.

Trzepacz, P.T., Tarter, R.E., Shah, A., Tringali, R., Faett, D.G. and Van, T.D. (1994). SPECT scan and cognitive findings in subclinical hepatic encephalopathy [published erratum appears in J Neuropsychiatry Clin Neurosci 1994 Fall;6(4):492]. *Journal of Neuropsychiatry & Clinical Neurosciences* **6** (2): 170-5.

Ukida, M., Morishita, H., Morimoto, Y., Usui, H. and Nagashima, H. (1988). Limited glutamine synthesis in brains of dogs with portacaval anastomosis after [¹⁵N] ammonium chloride loading. In: *Advances in ammonia metabolism and hepatic encephalopathy.*, P.B. Soeter, J.H.P. Wilson, A.J. Mejer and E. Holm (Ed.) New York, Elsevier Science Publisher. 433-45.

Van den Berg, C.J., Matheson, D.F., Ronda, G., Reijnierse, G.L.A., Blokhuis, C.G.D., Kroon, M.C., Clarke, D.D. and Garfinkel, D. (1975). A model of glutamate metabolism in the brain: a biochemical analysis of a heterogenous structure. In: *Metabolic compartmentation and neurotransmission.*, S. Berl, D.D. Clarke and D. Schneider (Ed.) New York, Plenum Press. 709-723.

Van Sande, M., Mardens, Y., Adraenssens, K. and Lowenthal, A. (1970). The free amino acids in human cerebrospinal fluid. *Journal of Neurochemistry* **17** 125-135.

Van Thiel, D.H., Gavalier, J.S. and Schade, R.R. (1985). Liver disease and the

hypothalamic pituitary gonadal axis. *Seminars in Liver Disease* **5** (1): 35-45.

Vatassery, G.T., Lai, J.C., Smith, W.E. and Quach, H.T. (1998). Aging is associated with a decrease in synaptosomal glutamate uptake and an increase in the susceptibility of synaptosomal vitamin E to oxidative stress. *Neurochemical Research* **23** (2): 121-5.

Vergara, F., Plum, F. and Duffy, T.E. (1974). Alpha-ketoglutarate: increased concentrations in the cerebrospinal fluid of patients in hepatic coma. *Science* **183** (120): 81-3.

Vidal, M. (1903). Le traitement chirurgical des ascites. *Presse Médicale* **11** 747.

Vitorica, J., Clark, A., Machado, A. and Satrustegui, J. (1985). Impairment of glutamate uptake and absence of alterations in the energy-transducing ability of old rat brain mitochondria. *Mechanisms of Ageing & Development* **29** (3): 255-66.

Volterra, A., Trotti, D., Tromba, C., Floridi, S. and Racagni, G. (1994). Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *Journal of Neuroscience*

von Hösslin, C. and Alzheimer, A. (1912). Ein Beitrag zur klinik, und pathologischen anatomie der Westphal-Strümpellschen pseudosklerose. *Z. Ges. Neurol. Psychiatr.* **8** 183-209.

Wallace, D.R. and Dawson, R.J. (1992). Ammonia regulation of phosphate-activated glutaminase displays regional variation and impairment in the brain of aged rats. *Neurochemical Research* **17** (11): 1113-22.

Waniewski, R.A. (1992). Physiological levels of ammonia regulate glutamine synthesis from extracellular glutamate in astrocyte cultures. *Journal of Neurochemistry* **58** (1): 167-74.

Wardas, J., Pietraszek, M., Schulze, G., Ossowska, K. and Wolfarth, S. (1997).