HAL
open science

Effets à court et à long terme d'un traitement chronique précoce au phénobarbital sur la maturation du métabolisme énergétique cérébral et sur le comportement du rat

Anne Pereira de Vasconcelos

To cite this version:

Anne Pereira de Vasconcelos. Effets à court et à long terme d'un traitement chronique précoce au phénobarbital sur la maturation du métabolisme énergétique cérébral et sur le comportement du rat. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1989. Français. NNT : 1989NAN10354 . tel-01754235

HAL Id: tel-01754235

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754235v1

Submitted on 30 Mar 2018

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE DE NANCY I UFR SCIENCES ET TECHNIQUES BIOLOGIQUES

THESE

de Doctorat de l'Université de Nancy I

présentée par

Anne PEREIRA de VASCONCELOS

UNIVERSITE NANCY BIBLIOTHEQUE-SCIENCES

EFFETS A COURT ET A LONG TERME D'UN TRAITEMENT CHRONIQUE PRECOCE AU PHENOBARBITAL SUR LA MATURATION DU METABOLISME ENERGETIQUE CEREBRAL ET SUR LE COMPORTEMENT DU RAT

Soutenue publiquement le 27 Novembre 1989

devant la Commission d'Examen

JURY :

Président :	M.	P. VERT, Pr, Nancy
Membres :	M.	P.F. BOUGNERES, CR, CNRS, Paris
	M.	J. GAYET, Pr, Nancy
	M.	B. KRAFFT, Pr, Nancy
	M.	E. MACKENZIE, DR, CNRS, Caen
	Mme	A. NEHLIG, DR, INSERM, Nancy

A la mémoire de mon père

A ma fille Marine

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé à l'Unité 272 de l'INSERM "Pathologie et Biologie du Développement Humain" à Nancy.

Ma reconnaissance s'adresse en tout premier lieu à Monsieur le Professeur P. VERT, Directeur de l'Unité INSERM 272 et Chef du Service de Médecine et Réanimation Néonatales de la Maternité Régionale de Nancy. Pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, pour la confiance et le soutien qu'il m'a accordés en toutes circonstances, qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde gratitude. C'est un grand honneur qu'il m'a fait en acceptant la Présidence de ce Jury.

Je suis très heureuse de pouvoir remercier Madame A. NEHLIG, Directeur de Recherche à l'INSERM, qui s'est chargée de ma formation de chercheur depuis mon entrée dans ce laboratoire. Par sa compétence, ses qualités professionnelles et humaines, elle est pour moi un maître et une amie. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur B. KRAFFT, Directeur du Laboratoire de Biologie du Comportement de la Faculté des Sciences de Nancy, pour son aide à la réalisation d'une étude comportementale en collaboration avec les membres de son laboratoire. Pour son accueil chaleureux, ses conseils judicieux et le temps qu'il a consacré pour juger ce travail, je le remercie très vivement.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur le Professeur J. GAYET, Directeur du Laboratoire de Physiologie Générale I de la Faculté des Sciences de Nancy, pour avoir accepté de faire partie de mon Jury. Je lui exprime toute ma reconnaissance pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail.

Pour l'honneur qu'ils me font de siéger dans ce Jury, je remercie Monsieur le Docteur P.F. BOUGNERES, Chargé de Recherche au CNRS à l'Unité 188 de l'INSERM à Paris et Monsieur le Docteur E. MACKENZIE, Directeur de Recherche au CNRS au Cyclotron Biomédical de Caen, pour avoir apporté leurs précieux concours pour juger ce travail.

Je voudrais également remercier Monsieur le Docteur Y. BADONNEL, Directeur du Laboratoire de Chimie Biologique de la Maternité Régionale de Nancy, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire, pour les judicieux conseils qu'il m'a prodigués ainsi que pour son aide dans la réalisation des dosages de glucose, de phénobarbital et d'acides aminés. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance.

C'est avec le Docteur J.L. DAVAL, Chargé de Recherche à l'INSERM, que j'ai réalisé l'étude sur les cultures de neurones. Je lui suis très reconnaissante pour l'aide et la formation qu'il m'a apportées et le remercie très sincèrement pour sa participation à ce travail.

Je voudrais également remercier le Docteur C. COLIN du Laboratoire de Biologie du Comportement de la Faculté des Sciences de Nancy, pour sa précieuse collaboration à nos études comportementales. Mes remerciements s'adressent également à Mesdames S. BOYET, S. THOMAS et Monsieur P. MICHEL pour leurs grandes compétences et leurs aides efficaces à la réalisation de ce travail.

Je remercie également Madame L. GOURET et Mademoiselle C. AUBERT pour leur précieux concours dans la présentation définitive de ce mémoire.

Je remercie également tous mes collègues et amis avec qui j'ai partagé quotidiennement joies et soucis. Leur aide, leurs critiques et conseils, et surtout la qualité de leurs relations m'ont été paticulièrement précieux. Qu'ils soient assurés de mon amitié et de ma profonde gratitude.

Je suis très reconnaissante à l'INSERM, à l'Association pour la Recherche en Médecine et Biologie du Développement Humain, ainsi qu'à la Fondation pour la Recherche Médicale pour m'avoir permis d'effectuer ce travail dans de très bonnes conditions.

AVANT-PROPOS p. 1

INTRODUCTION p. 5

1. PHENOBARBITAL p. 5

1.1. Mode d'action du phénobarbital p. 5

1.2. Effets d'une exposition précoce au phénobarbital sur la croissance p. 7

1.2.1. Phénobarbital et croissance corporelle p. 7
1.2.2. Phénobarbital et croissance cérébrale p. 8

1.3. Déficits neuromorphologiques p. 9

1.4. Effets d'une exposition précoce au phénobarbital sur la biochimie du cerveau en développement p. 11

1.4.1. Acides nucléiques, protéines et cholestérol p. 11
1.4.2. Variations du taux des hormones en relation avec les capacités d'induction enzymatique du phénobarbital p. 11
1.4.3. Effets du phénobarbital sur différents neurotransmetteurs p. 13

1.5. Effets du phénobarbital sur le comportement p. 15

1.5.1. Etudes en clinique p. 15
1.5.2. Etudes chez l'animal p. 16

2. MATURATION CEREBRALE ET METABOLISME ENERGETIQUE DU CERVEAU AU COURS DU DEVELOPPEMENT POSTNATAL p. 18

2.1. Maturation cérébrale et vulnérabilité du cerveau en développement p. 18

2.2. Utilisation du glucose par le cerveau mature p. 20

2.3. Utilisation du glucose par le cerveau immature p. 21

2.4. Utilisation des composés cétoniques par le cerveau immature p. 24

ANIMAUX ET TRAITEMENT PHARMACOLOGIQUE p. 27

1. ETUDES BIOCHIMIQUES p. 27

2. ETUDES COMPORTEMENTALES p. 28

CHAPITRE 1 : EFFETS A COURT TERME DU PHENOBARBITAL SUR LA MATURATION DU METABOLISME ENERGETIQUE CEREBRAL (Mémoires A, B, C) p. 29

1. EFFETS GENERAUX D'UN TRAITEMENT CHRONIQUE PRECOCE AU PHENOBARBITAL p. 29

2. EFFETS D'UNE EXPOSITION PRECOCE AU PHENOBARBITAL SUR LA CROISSANCE p. 30

2.1. Effets d'un traitement chronique précoce au phénobarbital sur la croissance corporelle et cérébrale du rat p. 30

2.2. Phénobarbital et croissance : effets de la dose et de la période du développement p. 31

2.2.1. Effets d'une exposition néonatale p. 31
2.2.2. Effets d'une exposition prénatale p. 32

2.3. Phénobarbital et croissance : effets de la sous-alimentation p. 33

3. EVOLUTION POSTNATALE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES ET CEREBRALES DE PHENOBARBITAL p. 34

3.1. Concentrations plasmatiques de phénobarbital p. 34

3.2. Concentrations de phénobarbital dans le cerveau p. 35

4. EFFETS DU PHENOBARBITAL SUR L'EVOLUTION POSTNATALE DES CONCENTRATIONS CIRCULANTES DE GLUCOSE ET DES COMPOSES CETONIQUES p. 35

5. EFFETS DU PHENOBARBITAL SUR LA MATURATION DU METABOLISME ENERGETIQUE CEREBRAL : INCORPORATION DU CARBONE DU GLUCOSE-(2-14C) ET DU ß-HYDROXYBUTYRATE-(3-14C) DANS LES ACIDES AMINES CEREBRAUX p. 38

5.1. Incorporation du carbone du glucose-(2-14C) dans les trois fractions de l'extrait acido-soluble cérébral p. 38

5.1.1. Evolution postnatale chez les témoins p. 38
5.1.2. Influence d'un traitement précoce au phénobarbital sur la répartition de la radioactivité dans les trois fractions de l'extrait acido-soluble cérébral p. 40

5.2. Incorporation du carbone du glucose-(2-14C) dans les acides aminés cérébraux : effets du phénobarbital p. 40

5.3. Incorporation du carbone du ß-hydroxybutyrate-(3-14C) dans les acides aminés cérébraux : effets du phénobarbital p. 41

5.3.1. Evolution postnatale chez les animaux témoins p. 41
5.3.2. Effets du phénobarbital p. 42

6. FACTEURS REGULANT L'UTILISATION DU GLUCOSE ET DES COMPOSES CETONIQUES DANS LE CERVEAU EN DEVELOPPEMENT p. 43

6.1. Utilisation des composés cétoniques par le cerveau p. 43

6.2. Régulation de l'utilisation des composés cétoniques dans le cerveau adulte p. 43

6.3. Régulation de l'utilisation des composés cétoniques dans le cerveau en développement p. 44

6.4. Facteurs contrôlant l'utilisation relative du glucose et des composés cétoniques par le cerveau en développement p. 45

7. MODE D'ACTION POSSIBLE DU PHENOBARBITAL SUR LE METABOLISME ENERGETIQUE CEREBRAL p. 48

8. EFFETS DU PHENOBARBITAL SUR LES CONCENTRATIONS EN ACIDES AMINES DU CERVEAU DE RAT p. 51

8.1. Evolution postnatale chez les témoins p. 52

8.2. Effets du phénobarbital p. 53

9. CONCLUSION : EFFETS DU PHENOBARBITAL SUR LA MATURATION BIOCHIMIQUE DU CERVEAU DE RAT EN DEVELOPPEMENT p. 55

CHAPITRE 2 : EFFETS A COURT ET A LONG TERME DU PHENOBARBITAL SUR L'UTILISATION CEREBRALE LOCALE DE GLUCOSE (Mémoires D, E, F) p. 56

1. THEORIE DE LA METHODE AUTORADIOGRAPHIQUE QUANTITATIVE AU 2-DESOXYGLUCOSE p. 56

1.1. Bases théoriques de la méthode au 2-désoxyglucose p. 57

1.1.1. Propriétés biochimiques du 2-désoxyglucose p. 57
1.1.2. Description du modèle théorique p. 58
1.1.3. Analyse mathématique du modèle p. 60

1.2. Considérations théoriques et pratiques - Limitations de la méthode p. 63

1.2.1. Mise en place de la méthode p. 63
1.2.2. Limitations de la méthode p. 64

1.3. Conclusion p. 67

2. MATERIELS ET METHODES p. 67

2.1. Animaux p. 67

2.2. Mesure de l'utilisation cérébrale locale de glucose p. 68

2.3. Calcul de l'utilisation cérébrale locale de glucose p. 69

2.4. Variables physiologiques p. 70

2.5. Analyse statistique p. 70

3. EFFETS A COURT ET A LONG TERME DU PHENOBARBITAL SUR L'UTILISATION CEREBRALE LOCALE DE GLUCOSE p. 71

3.1. Variables physiologiques p. 71

3.2. Effets du phénobarbital sur l'utilisation cérébrale de glucose p. 72

3.2.1. Utilisation cérébrale moyenne de glucose p. 72
3.2.2. Effets de l'âge et du traitement sur l'utilisation cérébrale locale de glucose : analyse de variance à deux facteurs p. 73
3.2.3. Effets du phénobarbital sur la maturation du métabolisme énergétique cérébral p. 73

3.3. Effets du phénobarbital sur l'utilisation cérébrale de glucose dans les systèmes sensoriels p. 76

3.3.1. Fonction auditive p. 76
3.3.2. Fonction visuelle p. 78

3.4. Effets à court et à long terme du phénobarbital sur l'utilisation cérébrale de glucose dans les aires corticales, l'hippocampe et le cervelet p. 80

3.4.1. Aires corticales p. 80
3.4.2. Hippocampe p. 82
3.4.3. Cervelet p. 83
3.4.4. Effets à long terme du phénobarbital sur l'utilisation de glucose dans les différentes couches cellulaires de l'hippocampe et du cervelet du rat adulte p. 83
3.4.5. Effets à long terme du phénobarbital sur le cervelet, l'hippocampe et le cortex cérébral : déficits neuromorphologiques, comportement et métabolisme énergétique p. 84

ATLAS DE NEUROANATOMIE p. 87

CHAPITRE 3 : EFFETS DU PHENOBARBITAL SUR DES CULTURES PURES DE NEURONES DE RAT (Mémoire G) p. 99

1. INTRODUCTION p. 99

1.1. Généralités p. 99

1.2. Historique p. 99

1.3. Ontogénèse de la formation des cellules neuronales : importance dans l'établissement de cultures monotypiques p. 100

1.4. Cultures de neurones p. 101

2. CULTURES PURES DE NEURONES D'EMBRYONS DE RAT p. 103

3. EFFETS DU PHENOBARBITAL SUR LA CROISSANCE DES NEURONES EN CULTURE p. 104

4. EFFETS DU PHENOBARBITAL SUR LE TRANSPORT DU GLUCOSE p. 107

5. EFFETS DU PHENOBARBITAL SUR LA SYNTHESE PROTEIQUE p. 110

6. EFFETS COMPARATIFS DU PHENOBARBITAL ET D'AUTRES ANTICONVULSIVANTS SUR DES NEURONES EN CULTURE p. 111

7. CONCLUSION p. 112

CHAPITRE 4 : EFFETS A LONG TERME DU PHENOBARBITAL SUR LE COMPORTEMENT DU RAT ADULTE (Mémoires E et F) p. 114

1. EFFETS A LONG TERME DU PHENOBARBITAL SUR L'ACTIVITE LOCOMOTRICE p. 114

2. EFFETS A LONG TERME DU PHENOBARBITAL SUR LE COMPORTEMENT DANS UN LABYRINTHE EN T : ALTERNANCE SPONTANEE p. 115

3. EFFETS A LONG TERME DU PHENOBARBITAL SUR LE COMPORTEMENT DANS UN LABYRINTHE A HUIT BRANCHES p. 120

APPENDICE STATISTIQUE p. 126

RESUME, CONCLUSION et PERSPECTIVES p. 128

BIBLIOGRAPHIE p. 135

LISTE DES PUBLICATIONS p. 161

ABREVIATIONS

ACA	Acétoacétate
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine 5'-diphosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
ßHB	ß-hydroxybutyrate
CBZ	Carbamazépine
CoA	Coenzyme A
2DG	2-désoxyglucose
DPH	Diphénylhydantoïne
dpm	Désintégrations par minute
DS	Déviation standard
DSCL	Débit sanguin cérébral local
DZ	Diazépam
ESM	Ecart standard à la moyenne
GABA	γ-aminobutyrate
LD50	Dose léthale pour 50 % d'animaux
LH	Hormone lutéinisante
mCi	Millicurie
µCi	Microcurie
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
PhB	Phénobarbital
SNC	Système nerveux central
TCA	Acide trichloracétique
UCLG	Utilisation cérébrale locale de glucose
UCMG	Utilisation cérébrale moyenne de glucose

AVANT-PROPOS

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressée aux effets secondaires d'un traitement anticonvulsivant au PhB sur le développement du cerveau. Le PhB est utilisé en clinique, en particulier en néonatologie dans le traitement et la prévention des crises convulsives chez le nouveau-né. En effet, les convulsions néonatales peuvent être sévères nécessitant la mise en place d'une thérapie anticonvulsivante et le PhB reste un médicament de choix dans le traitement des convulsions en période néonatale. De plus, ces convulsions sont parfois difficiles à maîtriser et des doses élevées de médicament peuvent être nécessaires afin d'obtenir des taux thérapeutiques efficaces. Le PhB a également été préconisé mais à des doses moindres dans certains cas d'hyperbilirubinémie. Chez l'enfant, ce médicament a été largement utilisé dans la prophylaxie des convulsions fébriles pendant des périodes pouvant durer plusieurs mois voire plusieurs années.

On peut se demander quels sont les effets d'une administration précoce prolongée de PhB en période néo et postnatale sur le développement du cerveau. Chez l'animal, une exposition précoce au barbiturique induit une diminution du poids corporel et cérébral. Le retard de croissance cérébrale s'accompagne de déficits neuromorphologiques spécifiques, en particulier au niveau du cervelet et de l'hippocampe. De plus, des perturbations à long terme du comportement et des capacités d'apprentissage ont également été mises en évidence après un traitement au PhB. Ceci pose en clinique la question des effets délétères du PhB sur le développement du cerveau et des fonctions cérébrales.

Pour aborder l'étude des effets du PhB sur le développement cérébral, le métabolisme énergétique cérébral présente un intérêt considérable. En effet, il existe une relation étroite entre le métabolisme énergétique et la fonction cérébrale. La mise au point de méthodes de mesure de l'utilisation cérébrale locale de glucose (UCLG) par autoradiographie quantitative a permis de montrer que la consommation cérébrale locale de glucose est bien corrélée à l'activité

fonctionnelle cérébrale locale. De plus, l'évolution postnatale de l'UCLG est étroitement liée aux changements anatomiques, comportementaux et fonctionnels se produisant dans le cerveau de rat au cours du développement postnatal.

Les effets du PhB sur la maturation du métabolisme énergétique cérébral du rat ont été étudiés tout d'abord à l'aide de méthodes biochimiques classiques permettant la mesure de l'incorporation du carbone du glucose-(2-^{14}C) et du ß-hydroxybutyrate-(3-^{14}C) dans les acides aminés cérébraux. En effet, la caractéristique fondamentale du métabolisme énergétique du cerveau mature in vivo est la forte et rapide incorporation du carbone du glucose dans les acides aminés. Cette voie métabolique se développe chez le rat entre le 10e et le 14e jour après la naissance. De plus, chez le rat en allaitement, les composés cétoniques, sous-produits de la dégradation hépatique des acides gras, sont prélevés activement par le cerveau immature et contribuent pour une part importante au métabolisme énergétique cérébral. En effet, le ß-hydroxybutyrate (ßHB) est un précurseur plus actif que le glucose de la biosynthèse des acides aminés chez le rat de la naissance au 15e jour postnatal.

Nous avons ainsi étudié les effets à court terme du PhB d'une part, sur l'évolution postnatale de l'utilisation des deux principaux substrats du métabolisme énergétique du cerveau et d'autre part, sur les teneurs cérébrales des acides aminés. Les résultats de cette étude font l'objet du premier chapitre.

La mesure du l'UCLG par autoradiographie quantitative utilisant le 2-désoxyglucose-(^{14}C) permet la mesure de l'utilisation de glucose simultanément dans l'ensemble des territoires cérébraux d'un animal conscient et représente un moyen d'étude de la fonction cérébrale. L'application dans notre laboratoire de cette méthode au rat en développement nous a permis d'étudier les effets à court et à long terme d'une exposition chronique précoce au PhB sur l'UCLG chez le rat en développement ainsi que chez l'animal adulte. Ce travail est présenté dans le second chapitre.

Les déficits neuromorphologiques spécifiques qui surviennent après une administration précoce de PhB chez le rat ou la souris ont permis de montrer la sensibilité de certains neurones au PhB. La culture de neurones issus de tissu cérébral embryonnaire permet les études de neurotoxicité des médicaments. La 3e partie de notre mémoire concerne les effets du PhB sur la croissance, le métabolisme énergétique et la synthèse protéique dans des neurones d'embryons de rat en culture.

L'étude des effets à court et à long terme du PhB sur la maturation du métabolisme cérébral a été complétée par une étude des effets à long terme d'un tel traitement sur le comportement du rat adulte. Nous avons ainsi mesuré l'activité locomotrice ainsi que les perfomances en situation d'apprentissage spatial en labyrinthes. L'alternance spontanée dans un labyrinthe en T et le comportement dans un labyrinthe à 8 branches ont été reliés à l'hippocampe, structure particulièrement sensible au PhB. Les effets à long terme du PhB sur le comportement du rat adulte sont présentés dans le dernier chapitre de notre thèse.

Les résultats de l'ensemble des études réalisées seront discutés afin de tenter de répondre aux questions suivantes :

- L'administration précoce et prolongée de PhB, en plus du retard de développement morphologique déjà connu, peut-elle être la cause d'altérations biochimiques?

- Le PhB affecte t-il l'utilisation cérébrale de glucose et/ou de ß-hydroxybutyrate? Peut-il être à l'origine de modifications des taux relatifs d'utilisation de ces deux principaux substrats du métabolisme énergétique cérébral chez le rat en développement?

- Quels sont les effets de ce médicament sur les concentrations cérébrales des acides aminés neurotransmetteurs et de leurs précurseurs?

- Quelles sont les structures cérébrales dont le métabolisme énergétique cérébral est perturbé par l'administration de PhB? Un tel traitement affecte t-il au plan métabolique, l'ensemble des structures cérébrales ou plus particulièrement les structures dont on a montré par ailleurs qu'elles étaient sensibles au PhB comme le cervelet et l'hippocampe?

- Une administration précoce de PhB perturbe t-elle à long terme l'utilisation cérébrale locale de glucose et peut-elle être à l'origine de déficits à long terme du comportement chez le rat adulte?

INTRODUCTION

1. PHENOBARBITAL

1.1. Mode d'action du phénobarbital

Le mécanisme d'action des barbituriques n'est pas encore complètement élucidé. Les barbituriques semblent interagir de manière spécifique avec les protéines membranaires et en particulier avec les récepteurs et pourraient inhiber ou stimuler les signaux transmembranaires (LaBella, 1981). Une telle interaction a été démontrée avec le récepteur du GABA-benzodiazépines. Plus récemment, une interaction des barbituriques avec le récepteur A1 de l'adénosine a été rapportée (Lohse et Coll., 1984). L'antagonisme au niveau de ces récepteurs pourrait contribuer aux propriétés excitatrices de ces médicaments alors que les effets dépresseurs seraient médiés par la liaison des barbituriques sur le récepteur GABAergique. Les barbituriques affectent également d'autres récepteurs comme les récepteurs nicotiniques et muscariniques de l'acétylcholine (Miller et Coll., 1982b ; Nordberg et Wahlstrom, 1984).

Les barbituriques ont des effets variés sur les membranes synaptiques et non synaptiques. Ils agissent au niveau postsynaptique en augmentant l'inhibition GABAergique, en réduisant l'excitation glutamatergique et cholinergique et en activant directement les canaux chlorure couplés aux récepteur du GABA. Au niveau présynaptique, les barbituriques réduisent l'entrée du calcium diminuant ainsi la libération de neurotransmetteurs. Ils diminuent également les conductances Na^+ et K^+ sur les membranes non synatiques. Cependant, certains de ces effets se produisent uniquement pour des concentrations élevées en médicament supérieures aux taux thérapeutiques utilisés en clinique humaine.

La sensibilité des synapses GABAergiques aux barbituriques suggère que celles-ci représentent un site important de l'action anesthésiante et anticonvulsivante des barbituriques (Ho et Harris, 1981). L'action anticonvulsivante de ces médicaments semble principalement liée à leurs

effets sur les membranes postsynaptiques (Faingold et Browning, 1987). A des concentrations proches de celles utilisées en clinique, le PhB modifie les réponses postsynaptiques des neurotransmetteurs : il augmente sélectivement l'inhibition GABAergique en agissant sur le complexe formé par le récepteur GABA-benzodiazépines (Macdonald, 1983 ; Macdonald et McLean, 1982 ; Macdonald et Coll., 1985 ; Olsen, 1981) et diminue l'excitation glutamatergique (Olsen et Coll., 1984 ; Schulz et Macdonald, 1981 ; Willow et Johnston, 1983). Ces effets se produisent à la même concentration. La localisation précise du site de liaison des barbituriques sur le complexe récepteur du GABA-benzodiazépines n'est pas connue. Ce site de liaison semble être un site modulateur proche du canal chlorure (Olsen, 1981 ; Twyman et Coll., 1989). L'hypothèse la plus ancienne postulait qu'il serait le site récepteur de la picrotoxine (Ramanjaneyulu et Ticku, 1984 ; Ticku et Olsen, 1978). Plus récemment, ces mêmes auteurs suggèrent qu'il existerait un site spécifique de liaison des barbituriques sur le complexe formé par le récepteur du GABA-benzodiazépines (Lehouillier et Ticku, 1989 ; Ticku et Rastogi, 1986).

Par contre, d'autres effets des barbituriques apparaissent uniquement à des concentrations largement supérieures à celles couramment utilisées en clinique humaine ; parmi ceux-ci, l'action GABAmimétique est observée pour des taux de médicament au moins 10 fois plus élevés que ceux permettant d'obtenir une augmentation des réponses GABAergiques (Macdonald et McLean, 1982 ; Yakushiji et Coll., 1989). De même, pour des teneurs élevées similaires à celles induisant une action GABAmimétique, les barbituriques augmentent les potentiels inhibiteurs en prolongeant les temps d'ouverture des canaux chlorures couplés au récepteur du GABA (Allan et Harris, 1986 ; Schwartz et Coll., 1985 ; Study et Barker, 1981 ; Twyman et Coll., 1989 ; Yakushiji et Coll., 1989). Pour des concentrations supérieures à celles utilisées en clinique, les barbituriques réduisent au niveau présynaptique la libération de neurotransmetteurs comme le GABA, le glutamate, l'aspartate, l'acétylcholine ainsi que la noradrénaline (Macdonald et McLean, 1982 ; Skerrit et Johnston, 1983) en réduisant l'entrée présynaptique du calcium (Blaustein et Ector, 1975 ; Ondrusek et Coll.,

1979). En effet, l'entrée du calcium dans les terminaisons présynaptiques est une étape essentielle du couplage excitation-secrétion. Cependant, les effets du PhB sur les potentiels d'action calcium-dépendants se produisent uniquement à des concentrations très élevées de médicament (Heyer et Macdonald, 1982).

L'ensemble des études réalisées principalement sur des cultures de neurones a permis de mettre en évidence des différences quantitatives entre d'une part, les barbituriques anticonvulsivants et d'autre part, les barbituriques utilisés pour leurs effets sédatifs. En effet, les concentrations de PhB produisant une modulation postsynaptique de la réponse des neurotransmetteurs sont plus faibles que celle induisant une réduction de la libération présynaptique de neurotransmetteurs et une hyperpolarisation des membranes postsynaptiques (Macdonald et McLean, 1982). Au contraire, le pentobarbital produit ces trois effets à des concentrations voisines.

1.2. Effets d'une exposition précoce au phénobarbital sur la croissance

1.2.1. Phénobarbital et croissance corporelle

1.2.1.1. Effets d'une exposition prénatale

Les études réalisées chez le rat ou la souris mettent en évidence une hétérogénéité importante des résultats en ce qui concerne les effets d'une exposition prénatale au PhB sur la croissance des animaux. En effet, une exposition prénatale au PhB induit chez le rat ou la souris soit une diminution du poids de naissance (Harris et Case, 1979 ; Martin et Coll., 1979 ; Patsalos et Wiggins, 1982 ; Seth et Coll., 1987), soit pas de changement du poids à la naissance des animaux traités au PhB par rapport aux témoins (Kleinberger et Yanai, 1985 ; Yanai et Coll., 1979). De plus, le PhB induit des déficits à long terme du poids des animaux au cours du développement postnatal pouvant persister à l'âge adulte. Kleinberger et Yanai (1985) mettent en évidence une diminution significative du poids des animaux uniquement à certains stades du

développement postnatal. Chez l'animal adulte traité en période prénatale au PhB, le poids corporel par rapport aux témoins est, soit diminué (Martin et Coll., 1979 ; Yanai et Iser, 1981) soit identique (Kleinberger et Yanai, 1985 ; Seth et Coll., 1987 ; Yanai et Coll., 1979).

1.2.1.2. Effets d'une exposition néonatale

Un traitement néonatal au PhB à la dose de 30 mg/kg/j n'affecte pas la croissance corporelle des jeunes rats (Schain et Watanabe, 1975). Par contre, à la dose de 60 mg/kg le PhB induit un retard de croissance qui se traduit à 21 jours par une diminution signicative de 20 % du poids des animaux traités au PhB par rapport aux témoins (Schain et Watanabe, 1975). Des résultats identiques ont été obtenus chez la souris au cours d'une exposition au PhB à la dose de 50 mg/kg (Kleinberger et Yanai, 1985). Les déficits du poids corporel induit par le PhB persistent après l'arrêt du traitement chez l'animal adulte (Bergman et Coll., 1982 ; Yanai et Bergman, 1981).

Afin de tenter de dissocier les effets du PhB de ceux de la sous-alimentation consécutive aux effets sédatifs des barbituriques, Diaz et Coll. (1977) ont étudié l'influence d'une exposition néonatale au PhB à la dose de 60 mg/kg/j chez des jeunes rats dont l'alimentation est contrôlée par la pose d'une canule intragastrique au 4e jour de vie postnatale et montrent que le poids des animaux traités au PhB à 19 jours est identique à celui des témoins. Ces résultats suggèrent que les effets du PhB pendant la période néonatale au moins sur la croissance corporelle sont certainement en grande partie d'origine nutritionnelle.

1.2.2. Phénobarbital et croissance cérébrale

1.2.2.1. Effets d'une exposition prénatale

Une exposition prénatale au PhB chez la souris du 9e au 21e jour de la gestation induit une diminution significative de 8 % du poids du cerveau à 22 et à 50 jours (Kleinberger et Yanai, 1985 ; Yanai et Coll.,

1979). Par contre, un traitement au PhB pendant la dernière semaine de la gestation n'affecte pas à long terme le poids du cerveau des animaux (Middaugh et Coll., 1981a, 1981b).

1.2.2.2. Effets d'une exposition néonatale

A la dose de 30 mg/kg, le PhB n'affecte pas la croissance cérébrale du rat. Par contre, une exposition néonatale au PhB à des doses plus élevées (60 mg/kg) induit des déficits à court terme du poids du cerveau (Schain et Watanabe, 1975). De même, chez la souris, un traitement au PhB aux doses de 40 ou 50 mg/kg induit également un retard de croissance cérébrale au cours du développement postnatal et les déficits du poids du cerveau persistent après l'arrêt du traitement chez l'animal adulte (Yanai et Bergman, 1981).

Diaz et Coll. (1977) montrent que chez des rats dont l'alimentation est contrôlée par la pose d'une canule intragastrique, un traitement au PhB à la dose de 60 mg/kg induit un retard de croissance cérébrale identique à celui observé par Schain et Watanabe (1975). Ces résultats montrent que les effets du PhB sur la croissance cérébrale sont certainement en grande partie des effets directs du médicament, non liés à la sous-alimentation qui pourrait résulter des effets sédatifs du PhB, en particulier au début du traitement.

1.3. Déficits neuromorphologiques

Yanai et ses collaborateurs montrent chez la souris âgée de 50 jours que des déficits neuronaux spécifiques sont associés au retard de croissance cérébrale induit par une exposition précoce au PhB.

En effet, un traitement prénatal au PhB du 9e au 18e jour de gestation induit à long terme un déficit de 30 % du nombre des cellules de Purkinje du cervelet et un déficit de 15 % du nombre des cellules pyramidales de l'hippocampe : ces deux catégories de cellules se forment avant la naissance. Un tel traitement n'affecte pas les cellules granulaires de l'hippocampe et du cervelet dont la période de

prolifération se situe chez la souris après la naissance. L'étendue des territoires occupés par les couches du cervelet, de l'hippocampe et du cortex cérébral ainsi que les neurones du cortex cérébral ne sont pas affectés par le PhB (Yanai et Coll., 1979). De plus, Kleinberger et Yanai (1985) montrent que le poids du cervelet est significativement diminué à 50 jours chez les souris traitées au PhB par rapport aux témoins. L'étude des effets du PhB à différentes périodes de la gestation a permis de montrer que les déficits cellulaires sont identiques à ceux observés après une exposition sur toute la période suggérant que le PhB est capable de détruire des neurones nouvellement formés (Bergman et Coll., 1980).

L'administration de PhB pendant la période néonatale induit une réduction de 22 à 33 % du nombre des cellules granulaires au niveau de l'hippocampe et du cervelet et également une diminution de 35 % du nombre des cellules de Purkinje du cervelet et des cellules pyramidales de l'hippocampe. Ces déficits cellulaires sont associés à une réduction des territoires occupés par les couches de l'hippocampe, du cervelet et du cortex cérébral et à une diminution du poids du cervelet à 50 jours (Kleinberger et Yanai, 1985 ; Yanai et Bergman, 1981 ; Yanai et Iser, 1981). De plus, le nombre des cellules corticales est réduit après une exposition néonatale au PhB (Yanai et Bergman, 1981). Chez le rat, des déficits au niveau des cellules de Purkinje du cervelet ont également été mis en évidence après une exposition au PhB à la fin de la gestation et se poursuivant pendant la période postnatale (Hannah et Coll., 1982).

Ces études ont permis de montrer que le PhB est capable de détruire non seulement des cellules en phase de prolifération, migration ou différentiation, mais aussi des neurones déjà formés (Yanai, 1984). Une exposition prénatale au PhB affecte le cervelet et à un degré moindre l'hippocampe ; le cortex cérébral n'est pas affecté. Une exposition néonatale au PhB induit des déficits importants au niveau du cervelet, de l'hippocampe et également au niveau du cortex cérébral. Cependant, il semble donc que le cortex soit moins sensible aux effets neurotoxiques du PhB (Yanai et Bergman, 1981).

L'étude de la croissance des dendrites au niveau de l'hippocampe et du cervelet a permis de montrer des anomalies à long terme de l'arborisation dendritique des neurones après une exposition précoce au PhB. Jacobson et Coll. (1988) montrent chez le rat que le PhB administré en fin de gestation induit un retard important du développement de l'arborisation dendritique des cellules de la région CA1 de l'hippocampe. De même, Hannah et Coll. (1988) et Yanai et Iser (1981) mettent en évidence des anomalies de la croissance des dendrites au niveau des cellules de Purkinje du cervelet de rat et de souris après une exposition néonatale au PhB.

1.4. Effets d'une exposition précoce au phénobarbital sur la biochimie du cerveau en développement

1.4.1. Acides nucléiques, protéines et cholestérol

Après une exposition prénatale au PhB chez la souris (Zemp et Middaugh, 1975) ou néonatale chez le rat (Diaz et Schain, 1977 ; Schain et Watanabe, 1975), les teneurs en acides nucléiques (ADN et ARN), protéines et cholestérol dans le cerveau sont réduites transitoirement pendant les trois premières semaines de vie postnatale. L'accumulation de cholestérol, retardée de manière importante au niveau du cervelet, pourrait refléter une interférence avec la myélinisation dans cette région cérébrale. L'administration de PhB pendant la période prénatale inhibe l'incorporation de leucine dans les fractions nucléaires brutes et dans les protéines de la myéline (Patsalos et Wiggins, 1982). In vitro, le PhB inhibe la synthèse protéique dans un système acellulaire dérivé du cerveau de rat de 7 jours (Swaiman et Stright, 1973).

1.4.2. Variations du taux des hormones en relation avec les capacités d'induction enzymatique du phénobarbital

Le PhB est un puissant inducteur des enzymes localisées dans les microsomes hépatiques et en particulier du système enzymatique conduisant à la glucurono-conjugaison. En médecine néonatale, cette

propriété a été mise à profit dans le traitement et la prophylaxie de l'ictère du nourrisson (Catz et Yaffé, 1968 ; Stern et Cashore, 1985 ; Valoes et Coll., 1980).

Après une administration du barbiturique chez l'animal adulte, l'induction des enzymes hépatiques est transitoire. Au contraire, après une exposition prénatale au PhB l'induction des enzymes d'oxydation au niveau hépatique est permanente et persiste chez l'animal adulte exposé in utero au médicament. Par contre, un traitement néonatal au PhB induit une augmentation à court terme de l'activité des enzymes semblable à celle observée chez l'adulte (Yanai et Wanich, 1985).

L'induction à long terme des enzymes microsomales qui métabolisent en particulier les stéroïdes affecte les taux circulants des hormones et perturbe ainsi la maturation sexuelle. En effet, une exposition prénatale au PhB chez le rat induit des perturbations de la maturation de la fonction reproductrice chez des animaux traités au PhB (Gupta et Coll., 1980a, 1980b, 1982). Ces auteurs montrent qu'un tel traitement induit chez les mâles une diminution de la distance anogénitale, un retard dans la descente des testicules ainsi qu'une baisse de la fertilité. Les déficits anatomiques et physiologiques s'accompagnent d'une diminution à long terme des concentrations circulantes de LH et de testostérone ainsi que des teneurs cérébrales en testostérone (Gupta et Coll., 1980a, 1982). Chez les femelles, une exposition précoce au PhB induit un délai dans l'apparition de la puberté, des désordres du cycle oestral ainsi qu'une baisse de la fertilité (Gupta et Coll., 1980b).

Chez l'animal adulte, un traitement chronique au barbiturique perturbe également la fonction reproductrice et induit une baisse des taux circulants de LH et de testostérone. Cependant, ces effets disparaissent à l'arrêt du traitement (Barradough et Coll., 1971 ; Gupta et Karavolas, 1973 ; Kaneyuki et Coll., 1979). Au contraire, une exposition prénatale au PhB induit des déficits durables qui persistent à l'âge adulte (Gupta et Coll., 1980a, 1980b, 1982).

Une exposition néonatale au PhB affecte transitoirement les taux circulants des hormones thyroïdiennes chez le rat et la souris ; ainsi, un traitement au PhB à la dose de 50 mg/kg élimine complètement le pic sérique de tyroxine qui apparaît à la fin de la deuxième semaine de vie postnatale chez les rongeurs (Dubois et Dussault, 1977 ; Fishman et Coll., 1982 ; Mémoires A et C). Fishman et Coll. (1982) suggèrent que l'hypothyroïdisme transitoire observé chez les animaux traités au PhB pourrait être à l'origine des déficits cellulaires cérébraux mis en évidence après une exposition précoce au PhB. En effet, des déficiences en hormones thyroïdiennes pendant la période néonatale induisent des perturbations sévères du développement du cerveau et en particulier de la synaptogénèse, de la neurotransmission, de la migration et de la différentiation cellulaire et de la myélinogénèse (Balazs, 1972 ; Dussault et Ruel, 1987 ; Nunez et Coll., 1980 ; Timiras, 1988 ; Timiras et Nzekwe, 1989 ; Vaccari, 1983). De plus, la croissance corporelle et cérébrale est retardée chez les animaux hypothyroidiens : la réduction du poids du cerveau est en partie liée à une diminution générale de la taille plutôt que du nombre des cellules (Eayrs et Taylor, 1951 ; Geel et Timiras, 1967 ; Pasquini et Coll., 1967 ; Redmond et Tuffery, 1981).

1.4.3. Effets du phénobarbital sur différents neurotransmetteurs

1.4.3.1. Catécholamines

On a montré chez le rat que des modifications au niveau des systèmes de neurotransmetteurs au cours du développement postnatal peuvent être à l'origine de déficits de l'activité ainsi que des capacités d'apprentissage (Raskin, 1983).

Une exposition prénatale au PhB chez la souris induit à 21 jours postnatals, une diminution des teneurs cérébrales en catécholamines sans affecter la sérotonine (Middaugh et Coll., 1981b). La réduction des concentrations cérébrales de catécholamines est transitoire et aucun déficit n'est observé chez l'animal adulte (Middaugh et Coll., 1981a). De même, Yanai (1983) met en évidence une diminution des concentrations de noradrénaline et de dopamine dans le striatum et l'hypothalamus de

souris traitées au PhB en période pré ou postnatale par rapport aux animaux témoins. De plus, une exposition précoce au PhB affecte le nombre des récepteurs cérébraux de la dopamine au cours du développement postnatal ainsi que chez l'adulte sans modifier l'affinité du récepteur (Iser-Strenger et Yanai, 1986 ; Seth et Coll., 1987).

Les effets du PhB sur les différents systèmes de neurotransmetteurs ont été corrélés à des modifications comportementales et biochimiques survenant après une exposition précoce au barbiturique. Un traitement précoce au PhB peut induire, soit une augmentation, soit une diminution de l'activité locomotrice en fonction de la période de traitement et du sexe des animaux (Diaz et Schain, 1978 ; Middaugh et Coll., 1981a, 1981b). Or, on montré que l'activité locomotrice peut être augmentée en stimulant les récepteurs postsynaptiques dopaminergiques (Kelly et Coll., 1975). De même, la sensibilité aux convulsions audiogènes peut être modifiée par le système dopaminergique et une augmentation de l'incidence des convulsions a été mise en évidence après une exposition néonatale au PhB (Yanai et Coll., 1981). Il a également été montré que des souris traitées in utero au PhB sont plus résistantes à l'hypothermie induite par l'apomorphine que les témoins (Yanai et Feigenbaum, 1981). L'apomorphine est un agoniste dopaminergique qui induit une hypothermie par action sur les récepteurs de la dopamine au niveau de l'hypothalamus rostral. Il semble donc que le PhB induise à long terme une augmentation de la sensibilité des récepteurs postsynaptiques dopaminergiques (Yanai, 1984).

1.4.3.2. Acétylcholine

Une exposition précoce au PhB affecte à long terme le comportement des animaux et plus particulièrement les comportements liés à l'hippocampe comme l'alternance spontanée dans un labyrinthe en T et le comportement dans un labyrinthe à huit branches (Pick et Yanai, 1984, 1985). Plusieurs systèmes de neurotransmetteurs sont impliqués dans les performances des animaux dans ces deux labyrinthes et l'influence du système cholinergique semble prédominante. En effet, différentes manipulations expérimentales comme l'application d'agonistes ou

d'antagonistes cholinergiques, les lésions expérimentales des voies cholinergiques septo-hippocampiques ainsi que les transplants chez des rats ayant subi des lésions suggèrent que la transmission cholinergique joue un rôle important dans les comportements liés à l'hippocampe (Eckerman et Coll., 1980 ; Low et Coll., 1982 ; Olton et Coll., 1978 ; Walsh et Coll., 1984 ; Yanai et Coll., 1987).

Un traitement prénatal au PhB induit chez la souris une diminution significative de l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase au niveau de l'hippocampe entre le 15e et le 22e jour de vie postnatale alors qu'une exposition prénatale n'affecte pas l'activité de cette enzyme. Ces déficits sont transitoires et disparaissent à l'âge adulte (Kleinberger et Yanai, 1985). Ces auteurs suggèrent que la diminution transitoire de l'activité de l'acétylcholinestérase pourrait être à l'origine des effets à long terme du PhB sur les comportements liés à l'hippocampe.

De plus, Yanai et Pick (1988) montrent chez la souris que des transplants de neurones cholinergiques sont capables de renverser en partie les déficits du comportement dans un labyrinthe à huit branches induits par une exposition prénatale au PhB alors que des transplants riches en neurones noradrénergiques n'améliorent pas les performances des animaux traités au PhB. Ces résultats suggèrent que le PhB pourrait induire des déficits comportementaux en altérant l'innervation cholinergique au niveau de l'hippocampe (Yanai et Pick, 1988).

1.5. Effets du phénobarbital sur le comportement

1.5.1. Etudes en clinique

A notre connaissance, les effets à long terme d'une exposition au PhB en période postnatale ont été peu étudiés. Par contre, chez l'enfant une administration prolongée de PhB peut induire des perturbations à court terme du comportement et de la fonction cognitive.

En effet, l'incidence des perturbations comportementales chez l'enfant sous PhB varie de 9 à 75 % (Camfield et Coll., 1979 ; Committee on drugs, 1985 ; Thorn, 1975 ; Wolf et Forsythe, 1978). Parmi celles-ci, l'hyperactivité est la plus fréquemment observée, mais des perturbations du sommeil, de la léthargie, de l'irritabilité, de la désobéissance et des symptômes dépressifs ont également été rapportés. Les déficits de comportement induits par le PhB ne sont pas dose-dépendants et disparaissent dans la plupart des cas dans les premières semaines ou les premiers mois de traitement (Camfield et Coll., 1979 ; Ferrari et Coll., 1983 ; Wolf et Forsythe, 1978).

Des altérations de la fonction cognitive ont été rapportées aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant au cours de traitements anticonvulsivants par le PhB. Ces perturbations se traduisent par des déficits dans les tests neuropsychologiques, des altérations de la mémoire à court terme ainsi qu'une réduction des performances dans les épreuves de concentration et de mémoire (Camfield et Coll., 1979 ; MacLeod et Coll., 1978 ; Thompson et Trimble, 1982, 1983 ; Vining et Coll., 1987).

1.5.2. Etudes chez l'animal

Les déficiences observées au niveau des capacités d'apprentissage chez l'animal sont considérées comme un modèle possible d'étude des troubles de l'intelligence ou des retards mentaux chez l'homme (Yanai, 1984).

Les premières études concernant les effets à long terme, chez le rat adulte, d'une exposition prénatale aux barbituriques à différentes périodes de la gestation ont montré une augmentation du nombre d'erreurs ainsi que du temps d'apprentissage dans un labyrinthe (Armitage, 1952 ; Murai, 1966). De même, Fonseca et Coll. (1976) observent une diminution des performances en labyrinthe de rats traités au PhB du 5e au 45e jour de vie postnatale.

Les déficits des capacités d'apprentissage en labyrinthe des animaux traités au PhB ne semblent pas liés à une diminution de l'activité locomotrice. Au contraire, Armitage (1952) met en évidence une hyperactivité chez les animaux traités au PhB. Des études ultérieures ont confirmé ces résultats montrant qu'une exposition prénatale au PhB pendant la dernière semaine de la gestation à différentes doses induit une augmentation de l'activité locomotrice des animaux et de leur réactivité à un stimulus (Middaugh et Coll., 1975, 1981a, 1981b). Par contre, une exposition néonatale au PhB induit à court et à long terme, soit une diminution, soit aucune variation de l'activité des animaux traités au PhB par rapport aux témoins (Diaz et Schain, 1977, 1978 ; Fonseca et Coll., 1976). Il apparaît que les effets d'une exposition précoce au PhB sur le comportement varient en fonction de la dose administrée, de la période et de la durée du traitement.

Des études plus récentes ont montré que la mémoire spatiale et les comportement liés à l'hippocampe sont affectés par une exposition précoce au PhB. Pick et Yanai (1984) mettent en évidence des déficits de l'alternance spontanée dans un labyrinthe en T après une exposition pré ou néonatale au PhB. De même, un tel traitement induit une augmentation significative du nombre d'erreurs dans un labyrinthe à huit branches chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins (Kleinberger et Yanai, 1985 ; Pick et Yanai, 1985 ; Yanai et Pick, 1988). Les déficits du comportement dans les deux types de labyrinthe sont plus importants après une exposition néonatale qu'après une exposition prénatale au PhB et pourraient être corrélés aux déficits neuronaux plus sévères qui apparaissent après un traitement néonatal au PhB en particulier, au niveau de l'hippocampe (Yanai et Bergman, 1981 ; Yanai et Coll., 1979).

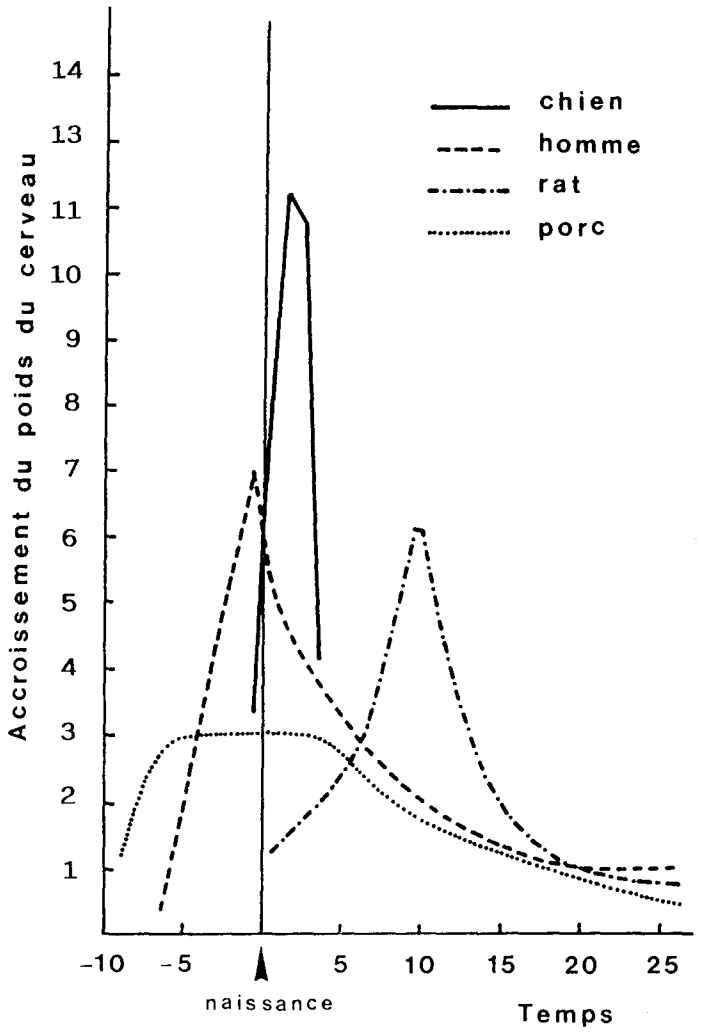


Figure 1 : Courbes de croissance cérébrale de différentes espèces exprimées en pourcentage du poids du cerveau de l'adulte par unité arbitraire de temps (Davison et Dobbing, 1966).
Les unités sont exprimées en mois chez l'homme, en semaines chez le chien et le porc et en jours chez le rat. L'accroissement du poids du cerveau est exprimé en pourcentage de la valeur de l'adulte.

2. MATURATION CEREBRALE ET METABOLISME ENERGETIQUE DU CERVEAU AU COURS DU DEVELOPPEMENT POSTNATAL

2.1. Maturation cérébrale et vulnérabilité du cerveau en développement

L'étude des changements morphologiques et histologiques se produisant dans le cerveau au cours des périodes pré et postnatale dans différentes espèces animales (Flexner, 1955) a permis d'établir le concept que certains animaux naissent relativement matures en ce qui concerne leur développement neurologique : ce sont les espèces dites "précoces" comme le singe, le cheval et le mouton. Au contraire, d'autres espèces sont peu développées à la naissance sur le plan neurologique : ce sont les espèces "non précoces" comme la souris, le rat, le chien et le chat. L'homme ainsi que le porc se situent entre ces deux groupes avec une croissance importante du cerveau au moment de la naissance. La figure 1 illustre les vitesses de croissance cérébrale en rapport avec la naissance dans différentes espèces. La période de croissance cérébrale rapide est transitoire et apparaît dans toutes les espèces. Chez le rat, elle commence à la naissance et se termine vers le 25e jour postnatal. Chez l'homme, elle débute au milieu de la gestation et se termine vers l'âge de 3 à 4 ans. Le rat à la naissance est comparable à un foetus humain de 25 semaines et le jeune rat de 7 à 8 jours à un nouveau-né à terme (Alling, 1985). Bien que la phase de croissance cérébrale rapide commence chez l'homme au milieu de la gestation, celle-ci se prolonge au delà de la 2e année de vie. Il apparaît ainsi que les 5/6 de la phase de la croissance rapide du cerveau humain sont postnatals (Dobbing et Sands, 1973). Si on considère le poids du cerveau à la naissance proportionnellement à celui de l'adulte dans différentes espèces, le poids du cerveau à la naissance est d'autant plus élevé que l'animal est plus mature. Il atteint 76 % du poids du cerveau adulte chez le singe nouveau-né (Check, 1975) alors que le cerveau d'un nouveau-né humain ne représente que 27 % de la valeur de l'adulte (Dobbing et Sands, 1973) et celui du rat à la naissance, 12 % du poids du cerveau adulte (Dobbing et Sands, 1970).

Associé à ce concept de maturation cérébrale en rapport avec la naissance, la notion de période critique ou vulnérable du développement du cerveau a été suggérée par Himwich (1951) et particulièrement développée par Davison et Dobbing (1966) et Dobbing (1968) comme une période où la myélinisation des structures cérébrales occupe une part importante. Flexner (1955) montre que la période critique du développement cérébral coïncide avec l'apparition de l'activité électrique caractéristique du cerveau adulte et de l'augmentation de l'activité des enzymes cérébrales, en particulier l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme oxydatif.

La notion de vulnérabilité du cerveau immature est associée au fait qu'il existe des stades du développement cérébral sensibles à des changements de l'environnement ou à l'influence d'agents toxiques capables d'induire des déficits irréversibles lorsqu'ils surviennent pendant ces périodes "critiques" du développement cérébral. Ainsi, les effets de la malnutrition ou du retard de croissance ont été particulièrement étudiés (Dobbings, 1968 ; Winick et Noble, 1966) et ont permis de montrer qu'il existe des périodes spécifiques de la croissance cérébrale pendant lesquelles la sous-alimentation induit des déficits permanents (Dobbings, 1971).

Dobbings (1971) suggère que la vulnérabilité du cerveau pourrait être directement reliée à la vitesse de croissance cérébrale. En effet, la phase de croissance cérébrale rapide est caractérisée par une augmentation importante du poids du cerveau liée à la croissance des neurones ainsi qu'à la prolifération des cellules gliales et à la myélinisation. Les divisions neuronales sont complètes avant le début de la phase de croissance rapide du cerveau sauf pour quelques neurones du cervelet qui prolifèrent plus tardivement (Flexner, 1955 ; Dobbing, 1971). Les évènements principaux caractérisant cette période de croissance rapide sont d'une part, la multiplication des oligodendrocytes qui occupe la première partie et d'autre part, l'accumulation des lipides et la myélinisation dans la seconde partie (Davison et Dobbing, 1968). Chez le rat, la myélinisation commence vers

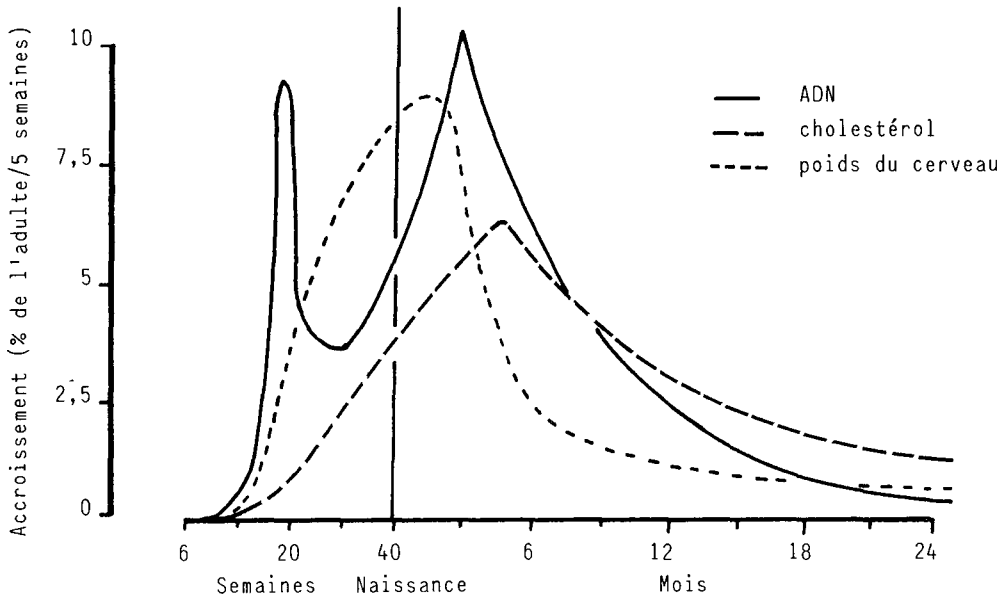


Figure 2 : Courbes représentant les taux d'augmentation de l'ADN (2 pics), du cholestérol (1 pic) et du poids frais du cerveau humain. Les valeurs ont été obtenues après analyse de 200 cerveaux humains normaux (Dobbing et Sands, 1973).

le 10-15e jour après la naissance pour atteindre un pic vers le 20e jour postnatal (Davison et Dobbing, 1966 ; Norton et Poduslo, 1973 ; Wiggins, 1982, 1986). L'accumulation des lipides dans le cerveau se fait au dépend du contenu en eau conduisant à une déshydratation progressive du tissu cérébral (Dobbing et Sands, 1970).

Les évènements caractéristiques de la croissance cérébrale peuvent être quantitativement définis par la mesure des taux d'ADN ainsi que par l'accumulation des lipides cérébraux. Les caractéristiques de la croissance du cerveau humain et du cerveau de rat sont illustrées respectivement sur les figures 2 et 3. On peut noter chez l'homme une courbe bimodale pour l'ADN correspondant à la multiplication des neuroblastes entre la 12e et la 18e semaine de gestation et la multiplication des cellules gliales après la naissance (Dobbing et Paths, 1974) (figure 2).

Un des évènements les plus importants du développement postnatal du rat, est le passage de l'utilisation des composés cétoniques et du glucose comme substrats du métabolisme énergétique cérébral pendant la période d'allaitement à une dépendance obligatoire du glucose dans le cerveau adulte (Cremer et Heath, 1974 ; Kraus et Coll., 1974 ; Page et Coll., 1971 ; Persson et Coll., 1972). Cependant, dans le cerveau adulte il existe des exceptions telles que le jeûne prolongé (Owen et Coll., 1967). Des études chez le rat et le cobaye suggèrent que l'apparition de l'utilisation presque exclusive du glucose, caractéristique du cerveau adulte est bien corrélée à l'apparition des différentes fonctions cérébrales : en effet, celles-ci semblent dépendre de la capacité du cerveau à oxyder complètement le glucose (Booth et Coll., 1980 ; Land et Coll., 1977 ; Leong et Clark, 1984).

2.2. Utilisation du glucose par le cerveau mature

L'affirmation que le glucose est le substrat presque exclusif du métabolisme oxydatif du cerveau adulte (Kety, 1957 ; Sokoloff, 1972 ; Vrba et Coll., 1962) repose d'une part, sur la mise en évidence des dégradations de la fonction cérébrale et du métabolisme énergétique

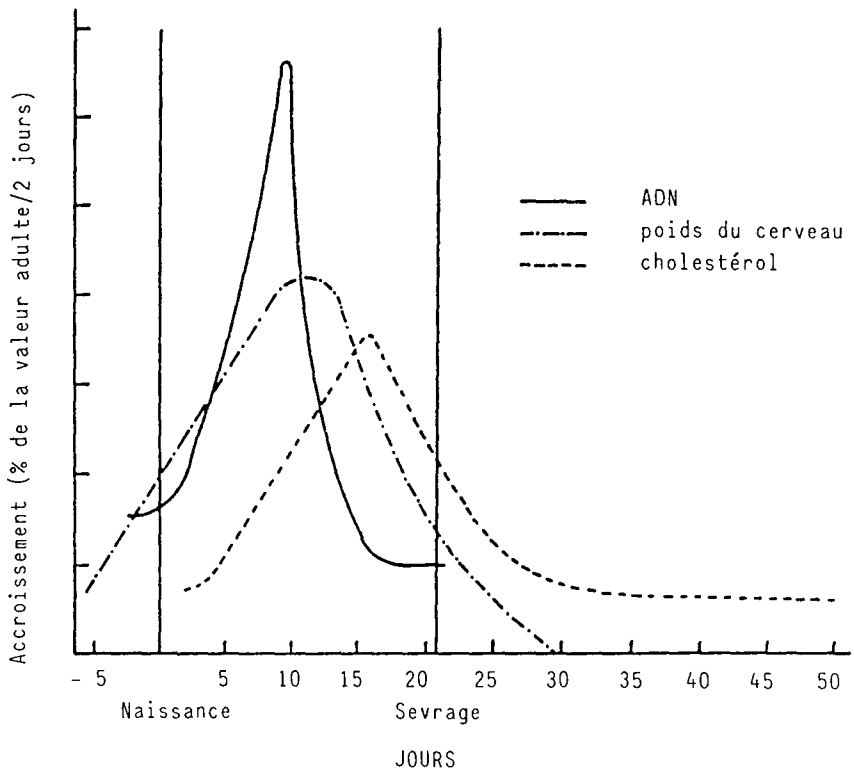


Figure 3 : Courbes représentant les taux d'augmentation de l'ADN, du cholestérol et du poids du cerveau de rat (Davison et Dobbing, 1968).

cérébral quand le cerveau est privé de glucose et d'autre part, sur l'incapacité d'autres substrats potentiels à prévenir ou à renverser les effets de l'hypoglycémie (Kety, 1957 ; Sokoloff, 1972).

L'incorporation rapide et importante du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux est une caractéristique fondamentale du métabolisme énergétique du cerveau mature in vivo (Busch et Coll., 1960 ; Gaitonde et Coll., 1965 ; Roberts et Coll., 1959 ; Vrba et Coll., 1962). Trente mn après l'injection de glucose-(U-^{14}C) à des rats adultes, plus de 98 % de la radioactivité est incorporée dans la fraction acido-soluble cérébrale. Cette fraction contient les composés neutres, les acides carboxyliques et les acides aminés. Ces derniers représentent 94 % de la radioactivité de cette fraction (Gaitonde et Coll., 1965).

La conversion rapide du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux est liée à plusieurs facteurs qui sont : la présence d'un pool de glucose et de glycogène cérébral peu important, le flux rapide et unidirectionnel du carbone du glucose au niveau de la glycolyse, la faible contribution d'autres substrats et l'existence d'un pool de glutamate important (Balazs, 1971).

En effet, chez l'adulte, la composition en acides aminés libres du cerveau diffère de celle des autres tissus par des teneurs élevées en glutamate, glutamine, aspartate et GABA (Lajtha et Coll., 1981 ; McIlwain et Bachelard, 1985). Ces acides aminés dérivent des intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques et jouent un rôle important en tant que neurotransmetteurs et précurseurs d'autres acides aminés dans le cerveau (Fonnum, 1984 ; Lajtha et Coll., 1981 ; McIlwain et Bachelard, 1985).

2.3. Utilisation du glucose par le cerveau immature

La maturation du métabolisme énergétique cérébral est caractérisée par des changements quantitatifs et qualitatifs accompagnés d'une augmentation importante de la consommation d'oxygène. En effet, la

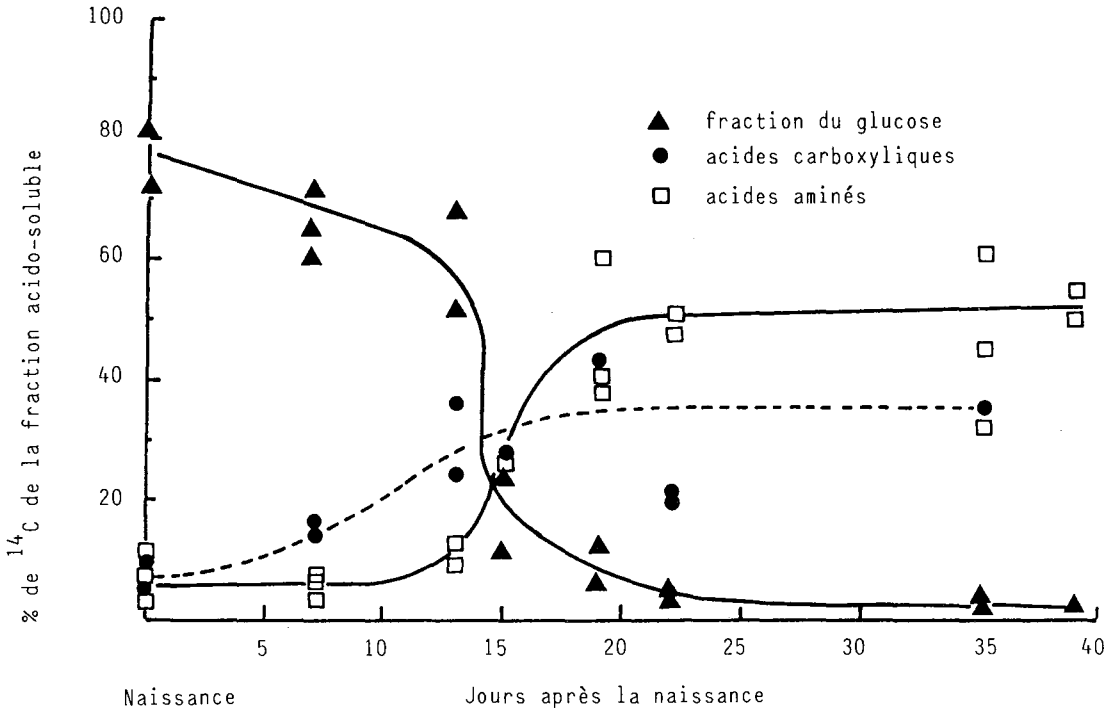


Figure 4 : Distribution de la radioactivité dans les fractions du glucose, des acides aminés et des acides carboxyliques du cerveau de rat en développement, 20 mn après l'injection de glucose-(U-^{14}C).
Abcisse : âge des rats
Ordonnée : ^{14}C dans les fractions exprimées en pourcentage du ^{14}C total dans l'extrait acido-soluble du cerveau de rat (Gaitonde et Richter, 1966).

consommation cérébrale d'oxygène est faible à la naissance et augmente jusqu'à la valeur de l'adulte qui représentent plus de deux fois celle observée à la naissance. Cette augmentation suit une courbe de croissance en S (Fazekas et Coll., 1951). Pendant cette période, le flux au travers du cycle de Krebs est au moins doublé et la capacité du cerveau à utiliser plusieurs substrats pour son métabolisme énergétique est remplacée par l'utilisation presque exclusive du glucose. Ces changements biochimiques apparaissent simultanément avec la croissance des processus neuronaux (Eayrs et Goodhead, 1959).

Gaitonde et Richter (1966) montrent que la caractéristique fondamentale du métabolisme énergétique cérébrale de l'adulte, c'est-à-dire la conversion rapide du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux, se développe pendant la période de maturation fonctionnelle entre le 10e et le 15e jour de vie postnatale chez le rat. En effet, 20 mn après l'injection de glucose-(U-^{14}C), le taux d'incorporation du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux est faible chez le rat de la naissance au 12e jour de vie puis augmente rapidement jusqu'au 19-22e jour pour atteindre à ce stade la valeur observée chez l'adulte (Cocks et Coll., 1970 ; Gaitonde et Richter, 1966 ; figure 4). De plus, dans le cerveau immature, pendant la période de synthèse active des lipides nécessaires à la constitution des membranes et plus particulièrement à la myélinisation, le glucose est métabolisé activement par la voie du shunt des pentoses-phosphate. En effet, plus de 50 % du glucose est métabolisé selon cette voie dans le cerveau de rat immature alors que chez l'adulte, uniquement 5 à 8 % du glucose est métabolisé par la voie du shunt des pentoses-phosphate (Hostetler et Coll., 1970 ; Winick, 1970). Celui-ci génère d'une part, du NADPH nécessaire à la biosynthèse des lipides et d'autre part, des pentoses pour la biosynthèse des nucléotides.

L'augmentation de la consommation cérébrale d'oxygène au cours du développement postnatal du rat reflète non seulement l'accroissement des besoins énergétiques associés au développement de l'activité fonctionnelle cérébrale mais également une augmentation concomittante de l'activité des enzymes mitochondriales impliquées dans le métabolisme

oxydatif. En effet, le taux de ces enzymes augmente à partir de la naissance, pendant la période de maturation cérébrale (Booth et Coll., 1980 ; Garcia-Argiz et Coll., 1967 ; Hamburgh et Flexner, 1957 ; Himwich, 1951 ; Leong et Clark, 1984 ; Sokoloff, 1973). De même, l'activité des enzymes liées au métabolisme du glutamate et du GABA (Agrawal et Davison, 1973 ; Roberts et Coll., 1951 ; Sims et Pitts, 1970) ainsi que les concentrations cérébrales des acides aminés, en particulier celles du glutamate, de l'aspartate et du GABA augmentent rapidement au cours de la même période (Agrawal et Davison, 1973 ; Agrawal et Coll., 1966 ; Bayer et McMurray, 1967 ; Patel et Balazs, 1970).

La mise au point de la méthode autoradiographique quantitative au 2-déoxyglucose-(^{14}C) (2DG-(^{14}C)) a permis de mesurer les taux d'utilisation de glucose dans l'ensemble des structures du système nerveux central d'animaux conscients (Sokoloff et Coll., 1977b). Cette méthode a été très largement utilisée pour déterminer l'utilisation de glucose dans les aires cérébrales spécifiques d'animaux adultes dans des conditions physiologiques, pharmacologiques, comportementales et pathologiques variées (Sokoloff, 1981). Chez l'adulte, ces différentes études ont permis de montrer que les taux d'utilisation de glucose varient de manière importante en fonction de la structure considérée et que l'utilisation régionale de glucose est bien corrélée au taux de débit sanguin local et à l'activité fonctionnelle cérébrale locale (Sokoloff, 1981). L'application de cette méthode à la mesure des taux régionaux d'utilisation cérébrale locale de glucose (UCLG) chez le rat au cours du développement postnatal par Nehlig et Coll. (1988a, 1988b) a permis de confirmer les résultats obtenus précédemment in vitro (Himwich, 1951) et in vivo sur le cerveau entier de rat immature (Gaitonde et Richter, 1966). L'UCLG est relativement faible et homogène entre 10 et 17 jour et s'accroît de manière importante au moment du sevrage, soit à 21 jours, où l'utilisation de glucose commence à se différencier et à devenir hétérogène. A 10 et 14 jours après la naissance les taux d'UCLG sont faibles de l'ordre de 20 à 30 µmol/100g/mn. A 17 jours, les taux d'UCLG augmentent légèrement mais demeurent relativement faibles et uniformes variant de 30 à 40

µmol/100g/mn. A 21 jours, l'UCLG apparaît plus différenciée dans la plupart des structures et est augmentée de 50 à 100 % par rapport au stade de 17 jours. A 35 jours, les taux d'UCLG augmentent dans de nombreuses structures se traduisant par une augmentation de 25 % du taux moyen d'utilisation de glucose par rapport au stade précédent. Entre 35 jours et le stade adulte l'utilisation de glucose augmente encore dans quelques structures cérébrales.

En conclusion, il apparaît que dans le cerveau en développement, la consommation d'oxygène, l'activité des enzymes mitochondriales impliquées dans le métabolisme oxydatif et la biosynthèse des acides aminés, le taux de conversion du carbone du glucose dans les acides aminés ainsi que dans les taux régionaux d'utilisation de glucose présentent une évolution sigmoïde similaire et atteignent chez le rat entre 20 et 30 jours les valeurs de l'adulte. Tous ces changements biochimiques sont bien correlés aux changements anatomiques, fonctionnels et comportementaux qui surviennent au cours du développement postnatal du rat.

2.4. Utilisation des composés cétoniques par le cerveau immature

Le cerveau, comme la plupart des autres tissus est capable d'une adaptation métabolique (McIlwain, 1971) même dans le choix de ses substrats pour son métabolisme énergétique (Krebs et Coll., 1971 ; Sokoloff, 1973). Bien qu'il n'ait pas été montré que le cerveau puisse fonctionner en l'absence complète de glucose, celui-ci peut en partie utiliser d'autres substrats quand l'apport en glucose est limité. Owen et Coll. (1967) ont les premiers mis en évidence la capacité du cerveau à utiliser les composés cétoniques du sang chez des hommes adultes, traités contre l'obésité par un jeûne complet et prolongé. En effet, les composés cétoniques, sous-produits de la dégradation hépatique des acides gras, peuvent être utilisés par le cerveau en fonction de leur concentration circulante (Daniel et Coll., 1971 ; Hawkins et Coll., 1971). Le rat à la naissance est transitoirement hypoglycémique, les taux de composés cétoniques du sang sont très bas, voisins de ceux de l'adulte dans des conditions physiologiques normales (Krebs et Coll.,

1971). Au début de l'allaitement, les concentrations circulantes de ces composés augmentent en raison de la richesse en graisses du lait maternel : cette cétose d'origine nutritionnelle persiste jusqu'au sevrage. Pendant l'allaitement, les composés cétoniques (ß-hydroxybutyrate et acétoacétate) sont prélevés par le cerveau immature et le prélèvement de ces substrats est pour une concentration artérielle donnée, 3 à 4 fois plus élevé chez le jeune rat, chez l'enfant et le nouveau-né humain que chez l'adulte (Dahlquist et Persson, 1976 ; Hawkins et Coll., 1971 ; Kraus et Coll., 1974 ; Krebs et Coll., 1971).

De plus, l'incorporation du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux est très faible chez le rat de la naissance au 10e jour postnatal (Gaitonde et Richter, 1966) et chez la souris de 10 jours (Van den Berg, 1970). Pourtant, les concentrations cérébrales de glutamate chez le jeune rat représentent environ 50 % de celles observées chez l'adulte, suggérant ainsi que cet acide aminé dérive en partie du moins d'un précurseur autre que le glucose. DeVivo et Coll. (1973, 1975) montrent que le ß-hydroxybutyrate (ßHß) est un précurseur plus actif de la biosynthèse des acides aminés cérébraux que le glucose chez le rat de la naissance au 15e jour postnatal. Plus récemment, Edmond et Coll. (1987) ont mis en évidence dans des cultures primaires de neurones, d'astrocytes et d'oligodendrocytes de cerveau de rat immature, une utilisation plus importante des composés cétoniques que du glucose comme substrat du métabolisme oxydatif dans les trois populations de cellules.

De plus, les composés cétoniques sont des substrats métaboliquement plus accessibles au cycle de Krebs que le glucose au cours du développement postnatal. Alors que la phosphorylation du glucose ne représente environ que le dixième du taux observé chez l'adulte pendant cette période (Moore et Coll., 1971), l'activité des enzymes spécifiques de l'utilisation des composés cétoniques présente une évolution unique. En effet, l'activité maximale à 20-25 jours est 4 à 5 fois plus élevée que celle de l'adulte pour la ß-hydroxybutyrate déshydrogénase et la 3-cétoacide CoA transférase. L'acétoacétyl-CoA thiolase a une activité maximale dès la naissance qui reste constante

jusqu'au 30e jour postnatal puis diminue ensuite pour atteindre les valeurs de l'adulte (Booth et Coll., 1980 ; Klee et Sokoloff, 1967 ; Krebs et Coll., 1971 ; Page et Coll., 1971).

L'induction précoce des enzymes du métabolisme des composés cétoniques contraste avec la maturation des enzymes-clé de la glycolyse comme l'hexokinase, la phosphofructokinase et la pyruvate déshydrogénase (Adlard et Dobbing, 1971 ; Booth et Coll., 1980 ; Cremer et Teal, 1974 ; Land et Coll., 1977 ; Stumpf et Kraus, 1979 ; Wilson, 1972). De plus, l'augmentation de l'utilisation des composés cétoniques pendant la période postnatale maintient des concentrations tissulaires en ATP et en citrate qui inhibent allostériquement l'activité de la phosphofructokinase favorisant ainsi la biosynthèse d'autres constituants à partir du glucose (glycolipides et protéines) pendant la période de croissance active cérébrale (Adlard et Dobbing, 1971 ; DeVivo et Coll., 1973).

ANIMAUX
ET TRAITEMENT
PHARMACOLOGIQUE

1. ETUDES BIOCHIMIQUES

Des rats Sprague-Dawley adultes, un mâle et deux femelles par cage ont été mis en accouplement pendant 5 jours. Les animaux ont été maintenus dans des conditions standard avec une alternance du cycle jour/nuit de 12 h (lumières allumées à 6h00). La nourriture et l'eau ont été disponibles à volonté. Après la naissance, les portées ont été réduites à 12 animaux. Le PhB dissous dans du sérum physiologique, a été administré par voie sous-cutanée aux jeunes rats entre le 2e et le 35e jour après la naissance à la dose de 50 mg/kg/j. Les animaux témoins ont reçu le même volume de sérum physiologique. Cette durée d'administration du médicament a été choisie car elle correspond à la période de maturation postnatale du cerveau de rat. En effet, à 30 jours la complexité et la densité de l'arborisation dendritique est proche de celle du rat adulte (Eayrs, 1955 ; Eayrs et Goodhead, 1959).

Pour les études au cours du développement, les expériences ont été réalisées environ 3 h après l'administration quotidienne de PhB. Les animaux ont été étudiés à 7, 10, 14, 17, 21 et 35 jours ainsi qu'au stade adulte (70-80 jours). Jusqu'à 35 jours les animaux des deux sexes ont été utilisés, sauf pour la mesure de l'utilisation cérébrale locale de glucose à 35 jours effectuée sur des rats mâles. De même, au stade adulte, les expériences ont porté uniquement sur des rats mâles pour éviter les variations du métabolisme énergétique cérébral dues à la cyclicité chez les femelles (Nehlig et Coll., 1985).

2. ETUDES COMPORTEMENTALES

Pour les études de comportements, les animaux ont été accouplés selon les mêmes modalités que pour les études biochimiques et maintenus dans des conditions standard d'élevage avec cependant un cycle jour/nuit de 12 h inversé (lumières allumées à 18h00). Après la naissance, les portées ont été réduites à 6 rats mâles. Les animaux ont été traités de la même manière que pour les études biochimiques par du PhB à la dose de 50 mg/kg/j du 2e au 35e jour de vie postnatale. Les animaux témoins ont reçu un volume équivalent de sérum physiologique. Douze portées témoins et 12 portées de rats traités au PhB ont été utilisées pour cette étude. Le comportement a été étudié chez des rats âgés de 70 à 90 jours. Tous les tests comportementaux ont été réalisés au début de la période sombre du cycle jour/nuit.

CHAPITRE 1

Effets à court terme du phénobarbital sur la maturation du métabolisme énergétique cérébral (mémoires A, B, C)

1. EFFETS GENERAUX D'UN TRAITEMENT CHRONIQUE PRECOCE AU PHENOBARBITAL

La dose de PhB administrée aux animaux dans cette étude est très inférieure à la LD50 pour l'administration parentérale de PhB chez le rat (Barnes et Eltherington, 1973). Cette dose permet d'obtenir des effets anticonvulsivants ainsi que des effets sur la croissance et le comportement similaires à ceux observés lors de traitements anticonvulsivants prolongés chez l'enfant. En effet, chez le rat les taux plasmatiques thérapeutiques et la concentration circulante de médicament minimale pour induire une intoxication neurologique sont proches de ceux observés en clinique humaine (Masuda et Coll., 1979). Cependant, la capacité métabolique du rat est supérieure à celle de l'homme (Albright et Burnham, 1980 ; Patsalos et Wiggins, 1982) et bien que les doses de PhB utilisées dans l'espèce humaine soient très inférieures à celles administrées aux jeunes rats, les taux plasmatiques de médicament chez l'enfant et le nouveau-né (Booker, 1982 ; Painter et Coll., 1978) sont comparables à ceux obtenus chez des rats traités au PhB à la dose de 50 mg/kg (la présente étude) ou même de 60 mg/kg (Diaz et Coll., 1977 ; Schain et Watanabe, 1976). De plus, les rats tolèrent des doses élevées de barbituriques sans effet apparent sur le comportement (Kuhlman et Coll., 1970).

Dans notre étude, le PhB induit au début du traitement une sédation transitoire pendant quelques heures, sans effet anesthésiant. Les effets sédatifs diminuent progressivement pour disparaître complètement vers la fin de la 2e semaine postnatale. La disparition des effets du PhB sur le comportement et le tonus musculaire est liée à la diminution des taux plasmatiques de PhB et au développement de la tolérance au médicament (Schain et Watanabe, 1975). Ces auteurs montrent chez le rat, qu'un traitement précoce au PhB à 60 mg/kg/j du 3e au 21e jour postnatal induit une sédation importante des animaux au début du traitement d'une durée d'environ 9 h le premier jour, puis les effets sédatifs diminuent progressivement et disparaissent complètement la dernière semaine de traitement. A une dose plus faible (30 mg/kg/j), le PhB n'affecte pas le comportement des animaux sauf le premier jour où on observe un effet sédatif pouvant durer 5 h (Schain et Watanabe, 1975).

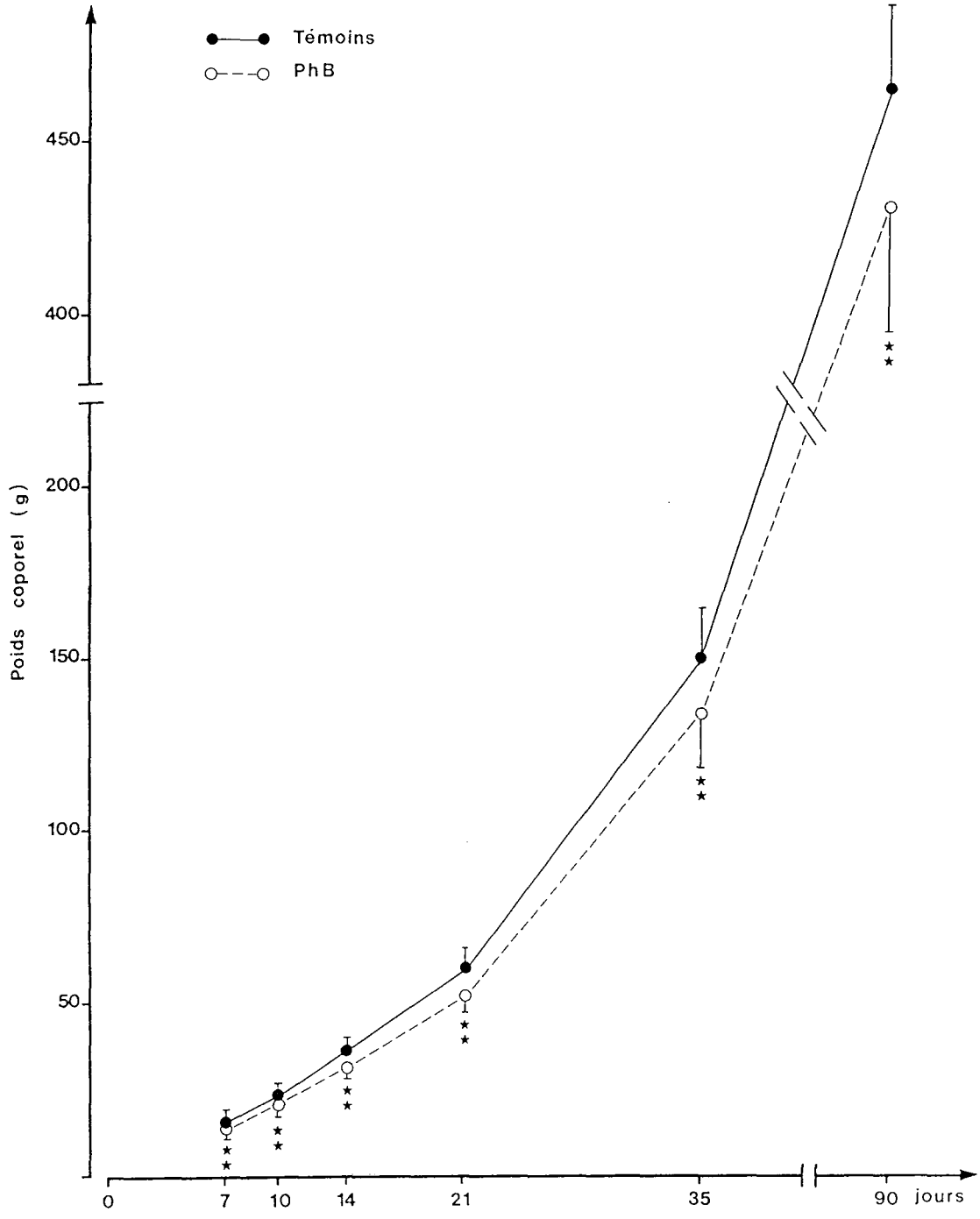


Figure 1 : Effets d'un traitement chronique précoce au PhB sur l'évolution postnatale du poids corporel du rat.

Les valeurs représentent des moyennes ± D.S. de 17 à 42 animaux.

** $p < 0,01$, différence statistiquement significative par rapport aux témoins (test t de Student).

De plus, dans notre étude, aucune variation de la température corporelle n'a été observée au cours des 3 à 4 h suivant l'injection de PhB, quel que soit l'âge des animaux.

En ce qui concerne la mortalité néonatale, dans notre étude 3 % des animaux traités au PhB à 50 mg/kg/j et 0,7 % des témoins sont morts dans la première semaine de vie postnatale. Aucun animal n'est décédé ultérieurement. Le faible taux de mortalité chez les rats traités au PhB montre que la dose utilisée est largement en dessous de la dose toxique de ce médicament chez le rat.

A la dose de 60 mg/kg/j de PhB, Schain et Watanabe (1975) observent chez le rat un taux de mortalité de 2 % au 3e jour postnatal et de 10,9 % pour toute la période de traitement, c'est-à-dire entre le 2e et le 21e jour après la naissance, alors que chez les animaux témoins, 4,2 % des rats sont morts pendant cette période. Cependant, chez la souris, le taux de mortalité très élevé (75,1 %) observé au cours d'une exposition néonatale au PhB à la dose de 60 mg/kg/j (Yanai et Bergman, 1981) montre que dans cette espèce, la sensibilité au médicament est plus importante que chez le rat. A la dose de 50 mg/kg/j, dose utilisée dans notre étude, le taux de mortalité chez la souris est de 27,6 % pendant la période de traitement, alors qu'il est de 6,1 % chez les témoins (Yanai et Bergman, 1981).

2. EFFETS D'UNE EXPOSITION PRECOCE AU PHENOBARBITAL SUR LA CROISSANCE

2.1. Effets d'un traitement chronique précoce au phénobarbital sur la croissance corporelle et cérébrale du rat

L'administration de PhB entre le 2e et le 35e jour de vie postnatale induit une diminution significative de 6 à 14 % du poids des animaux traités au PhB par rapport aux témoins tout au long de la période du développement étudiée ($p < 0,01$, test t de Student) (figure 1). De plus, le déficit de croissance induit par le PhB persiste

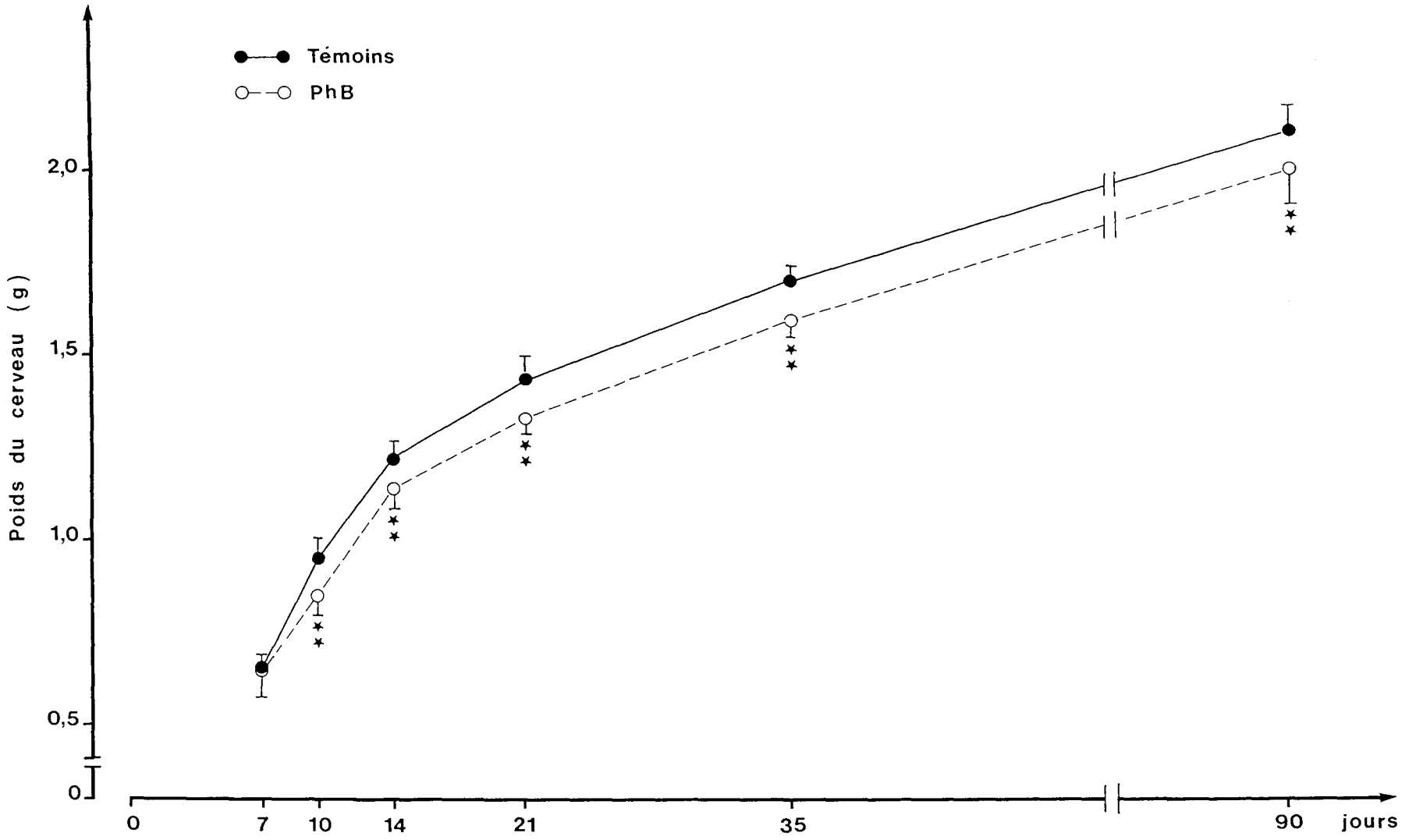


Figure 2 : Effets d'un traitement chronique précoce au PhB sur l'évolution postnatale du poids du cerveau de rat. Les valeurs représentent des moyennes ± D.S. de 5 à 22 animaux.
** $p < 0,01$, différence statistiquement significative par rapport aux témoins (test t de Student).

à l'âge adulte : à 90 jours, le poids des rats traités au PhB est significativement réduit par rapport aux témoins (figure 1).

L'administration précoce de PhB induit également un retard de croissance cérébrale qui apparaît au 10e jour postnatal et persiste à l'âge adulte (figure 2). La diminution du poids du cerveau observée chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins est significative à partir du 10e jour de vie postnatale et varie de 5 à 11 % ($p < 0,01$).

2.2. Phénobarbital et croissance : effets de la dose et de la période du développement

2.2.1. Effets d'une exposition néonatale

La réduction du poids corporel et cérébral induite par une exposition néonatale au PhB est dose-dépendante : chez le rat un traitement précoce à une dose inférieure ou égale à 30 mg/kg/j n'affecte pas la croissance corporelle ou cérébrale (Patsalos et Wiggins, 1982 ; Schain et Watanabe, 1975).

Par contre, le PhB induit un retard de croissance pour des doses supérieures ou égales à 40 mg/kg/j. Chez la souris, une baisse significative de 20 et 10 % du poids corporel a été mise en évidence respectivement à 22 et 50 jours après un traitement au PhB à la dose de 50 mg/kg/j. De plus, le poids du cerveau est réduit de 8 à 16 % au cours du développement postnatal ainsi que chez les animaux de 50 jours traités au PhB à 40 ou 50 mg/kg/j en période néonatale (Bergman et Coll., 1982 ; Kleinberger et Yanai, 1985 ; Yanai et Bergman, 1981). De même, nous avons mis en évidence une diminution significative du poids corporel et cérébral des rats traités au PhB à la dose de 50 mg/kg. Cette diminution persiste tout au long de la période de développement étudiée ainsi qu'à l'âge adulte (figures 1 et 2). Kleinberger et Yanai (1985) montrent que la réduction du poids du cerveau s'accompagne d'une baisse significative du poids du cervelet à 22 et à 50 jours ainsi que du poids de l'hippocampe à 22 jours.

Les effets de ce médicament sur la croissance corporelle du rat sont plus marqués au cours d'une exposition à 60 mg/kg/j ; en effet, le poids des animaux est réduit de 20,4 % à 21 jours (Schain et Watanabe, 1975). Les effets d'un tel traitement sur la croissance cérébrale du rat sont semblables à ceux observés à la dose de 50 mg/kg (Schain et Watanabe, 1975 ; figure 2). Diaz (1983) montre qu'une exposition plus tardive au PhB à la dose de 60 mg/kg à la fin de la phase de croissance rapide cérébrale, c'est-à-dire entre le 25e et le 39e jour postnatal chez le rat, induit également une diminution significative de 6 % du poids du cerveau chez les rats de 40 jours mais n'affecte pas le poids corporel des animaux.

2.2.2. Effets d'une exposition prénatale

Dans les effets à court terme, Patsalos et Wiggins (1982) ainsi que Seth et Coll. (1987) mettent en évidence une diminution du poids de naissance des rats nouveau-nés exposés in utero au PhB à 40 et 80 mg/kg/j. Cependant chez la souris, un traitement à 40 mg/kg n'affecte pas le poids de naissance des animaux (Middaugh et Coll., 1981b).

A long terme, un traitement prénatal au PhB à des doses variant de 40 à 80 mg/kg induit chez la souris une baisse significative du poids corporel et du poids du cerveau à la fois au cours du développement postnatal et chez l'adulte (Middaugh, 1986 ; Yanai et Coll., 1979 ; Zemp et Middaugh, 1975). Cependant, Kleinberger et Yanai (1985) ainsi que Seth et Coll. (1987) montrent qu'un traitement prénatal au PhB chez le rat et la souris n'affecte pas le poids corporel et cérébral à 21, 50 et 60 jours, alors que le poids du cervelet est significativement diminué de 9 % à 50 jours chez la souris (Kleinberger et Yanai, 1985) montrant ainsi la vulnérabilité spécifique de certains territoires cérébraux.

Un traitement prolongé au PhB chez la souris à la fois pendant la période pré et postnatale induit un retard de croissance semblable à celui observé lors d'une exposition néonatale (Bergman et Coll., 1982).

2.3. Phénobarbital et croissance : effets de la sous-alimentation

Les effets du PhB sur la croissance et en particulier sur la croissance cérébrale sont-ils directs ou liés à une sous-alimentation consécutive aux effets sédatifs du médicament ?

Diaz et Schain (1977) ont étudié les effets d'un traitement néonatal au PhB du 5e au 18e jour chez des jeunes rats dont l'alimentation est controlée par la pose d'une canule intragastrique au 4e jour de vie après la naissance. Alors que le poids corporel des rats nourris artificiellement n'est pas affecté par le PhB, les déficits du poids du cerveau de ces animaux sont comparables à ceux observés par Schain et Watanabe (1975). Diaz et Schain (1977) montrent ainsi qu'une administration chronique précoce de PhB induit un retard de croissance cérébrale important, non lié à la sous-alimentation.

De même, une étude comparative de l'influence d'un traitement au PhB et de la sous-alimentation pendant la période néonatale a permis de montrer que la croissance corporelle est significativement plus affectée par la sous-alimentation que par le PhB alors que c'est l'inverse pour le poids du cerveau (Schain et Watanabe, 1976). Ces résultats montrent que les effets du PhB sont en partie d'origine non nutritionnelle. Le PhB induit un retard général de croissance qui affecte le cerveau comme les autres organes, alors que la sous-alimentation produit un déficit important de la croissance corporelle qui semble relativement épargner le cerveau. En effet, la sous-alimentation précoce induit un retard de croissance qui s'accompagne d'une augmentation du rapport du poids du cerveau sur le poids corporel (Dobbing, 1970 ; Escriva et Coll., 1985 ; Wainwright et Coll., 1989 ; Warren et Bedi, 1985).

En conclusion, un traitement chronique précoce au PhB induit un retard de croissance corporelle et cérébrale. Les déficits du poids corporel et cérébral observés chez les animaux traités au PhB persistent

TABLEAU 1 : CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DE PHENOBARBITAL

AGE DES RATS (jours)	PHENOBARBITAL (µg/ml)
7	64 ± 5 (6)
10	70 ± 7 (6)
14	80 ± 9* (10)
17	71 ± 8* (14)
21	53 ± 6** (8)
35	41 ± 5** (11)

Les valeurs représentent les moyennes ± D.S. du nombre d'animaux indiqué entre parenthèses.
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, différences statistiquement significatives entre un stade du développement donné et le stade précédent (test t de Bonferroni).

à l'âge adulte. Ces effets sont dose-dépendants et apparaissent après une exposition pré ou postnatale. De plus, les effets du PhB sur la croissance cérébrale sont en partie directs et non liés à une sous-alimentation consécutive aux effets sédatifs de ce médicament.

3. EVOLUTION POSTNATALE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES ET CEREBRALES DE PHENOBARBITAL

3.1. Concentrations plasmatiques de phénobarbital

Les taux plasmatiques de PhB mesurés 3 h après l'injection quotidienne du médicament augmentent entre 7 et 14 jours après la naissance pour atteindre 80 µg/ml à 14 jours (tableau 1). L'augmentation des concentrations circulantes de PhB est statistiquement significative entre 10 et 14 jours ($p < 0,05$, test t de Bonferroni). A partir de 17 jours, les teneurs plasmatiques de médicament diminuent pour atteindre à 35 jours 41 µg/ml, c'est-à-dire la moitié de la valeur observée à 14 jours. La diminution des concentrations de PhB est statistiquement significative pour tous les stades étudiés à partir de 17 jours (test t de Bonferroni) (tableau 1).

Schain et Watanabe (1976) montrent que la demi-vie plasmatique du PhB est de 5 h chez des rats de 21 jours traités à partir du 3e jour à la dose de 60 mg/kg/j. Le pic de concentration circulante de médicament observé chez le rat de 21 jours est de 70 µg/ml, 1 h après l'injection. Diaz et Coll. (1977) obtiennent des taux plasmatiques de PhB similaires avec cependant une demi-vie du barbiturique de 10,5 h chez des rats âgés de 19 jours, traités à la dose de 60 mg/kg/j à partir du 5e jour postnatal.

Chez l'animal adulte, après un traitement aigu au PhB à la dose de 50 mg/kg en dose de charge suivi de deux doses d'entretien à 25 mg/kg à 12 h d'intervalle, la concentration plasmatique de PhB est de 29,8 µg/ml, 3 h après la dernière injection (Jones et Woodbury, 1976). Patsalos et Lascelles (1981) montrent que chez le rat adulte, 3 h après

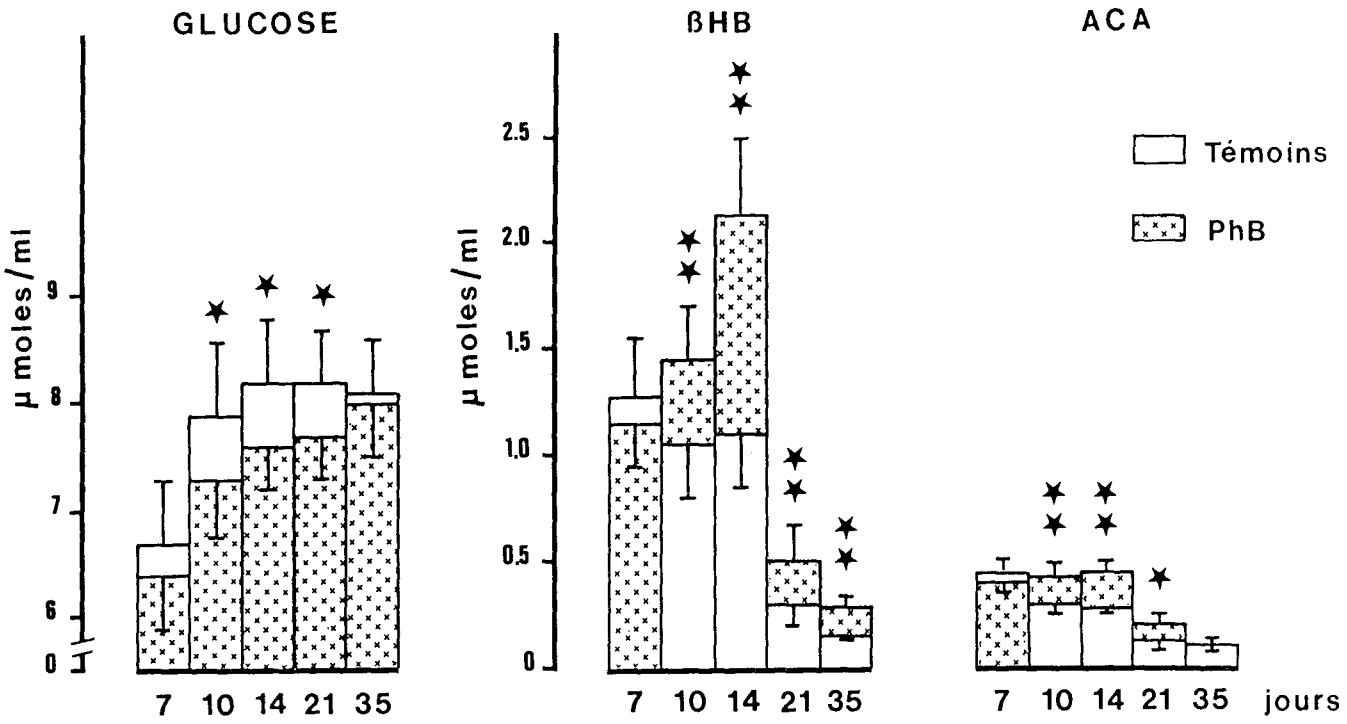


Figure 3 : Effets d'un traitement chronique précoce au PhB sur l'évolution postnatale des concentrations circulantes de glucose, ß-hydroxybutyrate (ßHB) et acétoacétate (ACA).
Les valeurs représentent des moyennes ± D.S. de 4 à 12 expériences.
* $p < 0,05$,** $p < 0,01$, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins (test t de Student).

l'injection d'une dose unique de PhB (100 mg/kg), les taux circulants de médicament est de 82,6 µg/ml. Ce taux est comparable à ce que nous avons observé chez les rats de 14 jours (tableau 1).

3.2. Concentrations de phénobarbital dans le cerveau

Dans notre étude nous n'avons pas mesuré les concentrations cérébrales de PhB. Cependant, au cours d'un traitement néonatal à la dose de 50 mg/kg/j chez la souris, les concentrations de médicament dans le cerveau atteignent 45 µg/g au début du traitement et restent stables pendant 24 h (Yanai et Bergman, 1981). A partir du 10e jour après la naissance, la clairance du médicament augmente et à 20 jours, le pic de concentration cérébrale de PhB représente seulement 1/3 de la valeur observée au 2e jour ; au 10e jour, le médicament n'est plus décelable 4 h après l'injection (Yanai et Bergman, 1981).

Chez la souris adulte, Middaugh (1986) et Middaugh et Coll. (1981c) montrent qu'après un traitement aigu au PhB à des doses de 20 à 80 mg/kg, les concentrations cérébrales de PhB varient de 11,4 à 44,0 µg/g, 1 h après l'injection.

4. EFFETS DU PHENOBARBITAL SUR L'EVOLUTION POSTNATALE DES CONCENTRATIONS CIRCULANTES DE GLUCOSE ET DES COMPOSES CETONIQUES

L'administration précoce de PhB induit une diminution significative de 6 à 14 % des concentrations plasmatiques de glucose entre le 10e et le 21e jour postnatal chez les animaux traités par rapport aux témoins ($p < 0,05$, test t de Student). Cependant, un tel traitement n'affecte pas la glycémie à 7 et 35 jours après la naissance (figure 3). De plus, chez les animaux traités au PhB, les concentrations sanguines de composés cétoniques (ß-hydroxybutyrate et acétoacétate) sont augmentées à partir du 10e jour, en particulier en ce qui concerne les taux de ß-hydroxybutyrate (ßHB). En effet, chez les animaux traités au PhB, les taux sanguins de ßHB augmentent jusqu'à 14 jours pour atteindre un maximum : à ce stade, la valeur observée représente deux

fois celle obtenue chez les animaux témoins. A 21 et 35 jours, les taux de ßHB circulants sont significativement augmentés respectivement de 40 et 45 % par rapport aux témoins ($p < 0,01$). De même, chez les animaux traités au PhB les teneurs en acétoacétate (ACA) sont significativement plus élevées que chez les témoins à 10, 14 ($p < 0,01$) et 21 jours ($p < 0,05$). A 35 jours, aucune différence dans les concentrations circulantes d'ACA n'apparaît entre les deux groupes d'animaux (figure 3).

En conclusion, l'exposition précoce au PhB perturbe l'évolution postnatale de la glycémie et induit chez le jeune rat une diminution des taux de glucose entre 10 et 21 jours après la naissance. De même, un tel traitement affecte l'évolution des teneurs du sang en composés cétoniques au cours du développement postnatal du rat. Les valeurs observées chez les animaux traités au PhB sont significativement augmentées, en particulier à 14 jours après la naissance.

Chez le rat avant la naissance, le substrat principal du métabolisme oxydatif cérébral est le glucose provenant de la circulation maternelle et traversant la barrière placentaire. A la naissance, au début de l'allaitement, l'alimentation riche en glucides est remplacée par le lait maternel riche en lipides. Les concentrations en composés cétoniques du sang augmentent lentement au cours des 4 h suivant la naissance puis plus rapidement entre 12 et 16 h pour atteindre à 24 h de vie une concentration 10 fois supérieure à celle observée à la naissance (Snell et Walker, 1973 ; Ferré et Coll., 1978). Les teneurs en composés cétoniques du sang augmentent dans les premiers jours qui suivent la naissance. La concentration sanguine de ßHB est environ 6 fois plus élevée chez le rat en allaitement que chez l'adulte et représente environ le double de celle de l'ACA (Girard et Coll., 1973 ; Krebs et Coll., 1971 ; Page et Coll., 1971). Les taux sanguins de ßHB et d'ACA sont élevés du 1er au 20e jour après la naissance puis diminuent au moment du sevrage lorsque le lait maternel est progressivement remplacé par une alimentation riche en glucides (Carney Crane, 1983 ; DeVivo et Coll., 1975 ; Hawkins et Coll., 1971 ; Page et Coll., 1971).

Au cours du développement postnatal, la glycémie varie peu ; elle augmente légèrement entre le 6e et 10e jour (Page et Coll., 1971). Dans notre étude, chez les animaux témoins, nous avons observé une évolution postnatale des concentrations en composés cétoniques et en glucose comparable à celle précédemment décrite dans la littérature (DeVivo et Coll., 1975 ; Page et Coll., 1971).

L'augmentation des teneurs en composés cétoniques du sang induite par le PhB peut être due à une biosynthèse accrue au niveau du foie et/ou à une augmentation du taux d'acides gras non estérifiés libres dans le sang. Dans le foie, l'activité de certaines enzymes importantes de la biosynthèse des composés cétoniques pourrait être augmentée. En effet, le PhB est un inducteur des enzymes microsomales hépatiques (Ioannides et Parke, 1975 ; Valerino et Coll., 1974). De plus, chez la souris, un traitement néonatal au PhB du 2e au 21e jour postnatal à la dose de 50 mg/kg/j induit une augmentation à court terme de l'activité des enzymes d'oxydation microsomales, comparable à celle observée chez l'adulte après une exposition chronique au barbiturique (Yanai, 1979 ; Yanai et Wanich, 1985). Ces auteurs montrent que chez les animaux traités au PhB à partir du 2e jour postnatal, l'activité des enzymes impliquées dans l'oxydation des médicaments est multipliée par 3 au 22e jour puis diminue pour atteindre les valeurs des témoins une semaine après l'arrêt du traitement.

En effet, l'augmentation d'une part, de la carnitine acyltransférase, enzyme catalysant le transfert des chaînes d'acyl-CoA du cytosol dans les mitochondries et d'autre part, des enzymes de la ß-oxydation pourrait stimuler la biosynthèse des composés cétoniques dans le foie. De plus, le PhB pourrait agir sur l'équilibre glucidique dans le foie et favoriser ainsi la biosynthèse des composés cétoniques. Au niveau extra-hépatique, le PhB pourrait également avoir une action sur certaines hormones comme le glucagon ou l'insuline et influencer les teneurs en glucose et/ou en acides gras non estérifiés dans le sang (Robinson et Williamson, 1980).

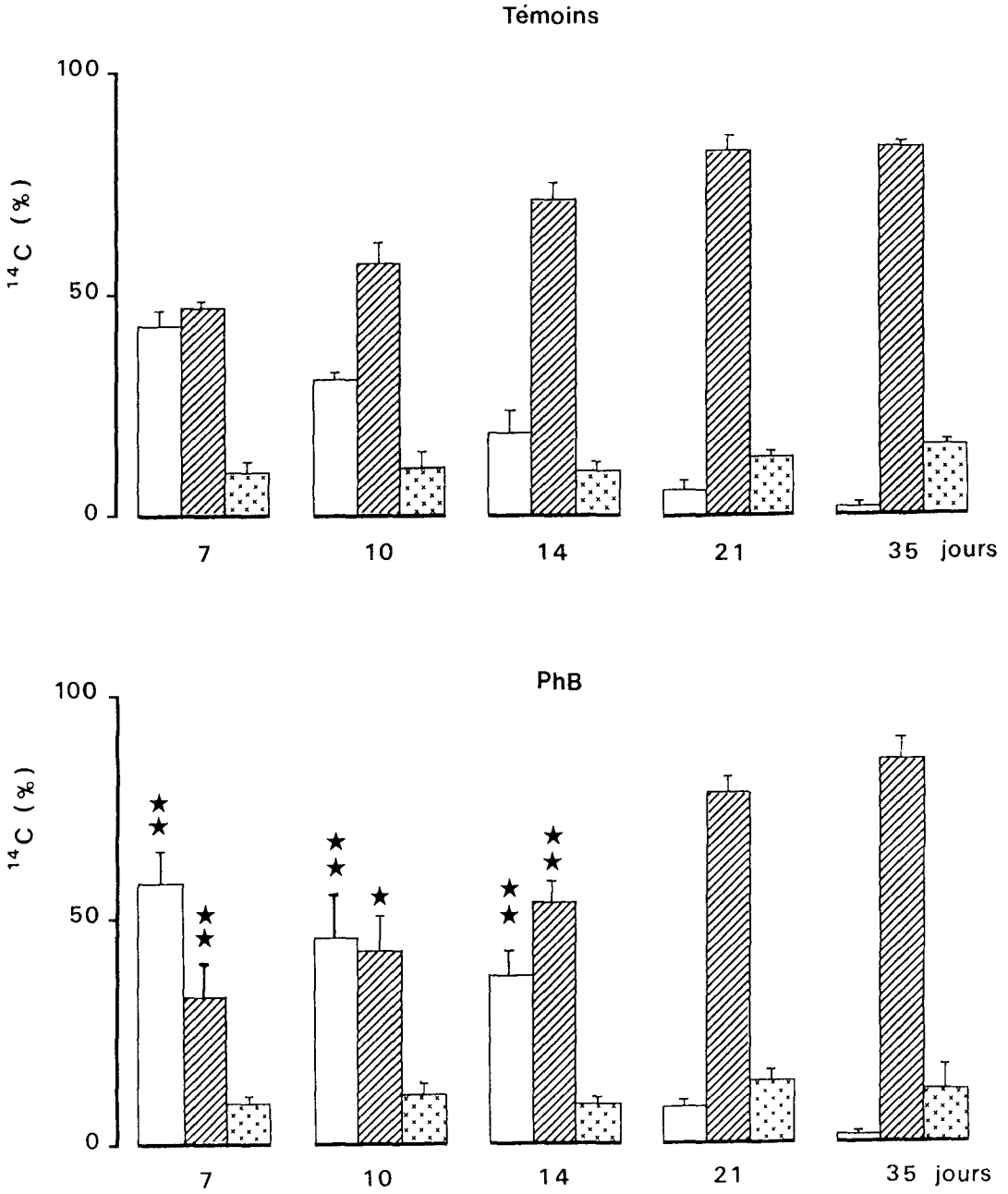


Figure 4 : Effets d'un traitement chronique précoce au PhB sur la distribution du ^{14}C (%) du glucose-(2-^{14}C) dans les trois fractions de l'extrait acido-soluble du cortex cérébral de rat.
Les valeurs représentent des moyennes ± D.S. de 3 à 4 expériences.
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins (test t de Student).

glucose

acides aminés

acides carboxyliques

5. EFFETS DU PHENOBARBITAL SUR LA MATURATION DU METABOLISME ENERGETIQUE CEREBRAL : INCORPORATION DU CARBONE DU GLUCOSE-(2-^{14}C) ET DU ß-HYDROXYBUTYRATE-(3-^{14}C) DANS LES ACIDES AMINES CEREBRAUX

5.1. Incorporation du carbone du glucose-(2-^{14}C) dans les trois fractions de l'extrait acido-soluble cérébral

L'incorporation du carbone du glucose dans les acides aminés a été étudiée dans trois structures cérébrales : le cortex cérébral, les structures sous-corticales et le cervelet. La figure 4 représente l'évolution postnatale de la radioactivité dans les trois fractions de l'extrait acido-soluble du cortex cérébral, 30 mn après l'injection de glucose-(2-^{14}C) chez les témoins et chez les animaux traités au PhB.

5.1.1. Evolution postnatale chez les témoins

Le pourcentage de marquage sur la fraction du glucose diminue au cours du développement postnatal et plus particulièrement entre 14 et 21 jours. Au contraire, la radioactivité de la fraction des acides aminés augmente avec l'âge postnatal pour atteindre 78 à 83 % de la radioactivité totale de l'extrait acido-soluble à 35 jours (figure 4).

L'évolution postnatale de l'incorporation du carbone du glucose dans les acides aminés au niveau des trois structures cérébrales est similaire à celle observée dans le cerveau entier par Cocks et Coll. (1970), DeVivo et Coll. (1975) et Gaitonde et Richter (1966).

La conversion rapide du carbone du glucose dans les acides aminés est la caractéristique fondamentale du métabolisme énergétique cérébral et reflète la coordination finale du métabolisme énergétique dans le cerveau de l'adulte (Busch et Coll., 1960 ; Gaitonde et Coll., 1965 ; Roberts et Coll., 1959 ; Vrba et Coll., 1962). En effet, 30 mn après l'injection de glucose-(U-^{14}C) à des rats adultes, plus de 98 % de la radioactivité est incorporée dans la fraction acido-soluble cérébrale. Cette fraction contient les composés neutres, les acides aminés et les acides carboxyliques ; les acides aminés représentent 94 % de la

radioactivité de cette fraction (Gaitonde et Coll., 1965). L'incorporation du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux est très faible chez le rat nouveau-né (DeVivo et Coll., 1973 ; Gaitonde et Richter, 1966) ainsi que chez la souris de 10 jours (Van den Berg, 1970). Chez le rat, cette voie métabolique se développe essentiellement entre 10 et 15 jours après la naissance (Cocks et Coll., 1970 ; DeVivo et Coll., 1975 ; Gaitonde et Richter, 1966) pendant la phase active de croissance cérébrale (Balazs et Coll., 1971).

L'évolution postnatale de l'utilisation de glucose en tant que précurseur de la biosynthèse des acides aminés cérébraux (Gaitonde et Richter, 1966) et de l'utilisation cérébrale locale de glucose (Nehlig et Coll., 1988a, 1988b) est parallèle à l'augmentation de la consommation cérébrale d'oxygène. En effet, celle-ci suit une courbe de croissance en S : la consommation cérébrale d'oxygène ne varie pas de la naissance au 10e jour de vie postnatale puis augmente rapidement après 10 jours pour atteindre à 24 jours la valeur de l'adulte qui représente deux fois la valeur observée chez le rat nouveau-né (Fazekas et Coll., 1951).

De plus, l'apparition de l'incorporation rapide du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux est associée à l'augmentation des concentrations en acides aminés libres du cerveau, en particulier celle du glutamate (Agrawal et Coll., 1966 ; Patel et Balazs, 1970). L'activité des systèmes enzymatiques mitochondriaux impliqués dans l'oxydation des substrats augmente pendant la maturation postnatale et est corrélée à l'apparition de l'incorporation rapide du carbone du glucose dans les acides aminés (Garcia Argiz et Coll., 1967 ; Sokoloff, 1973).

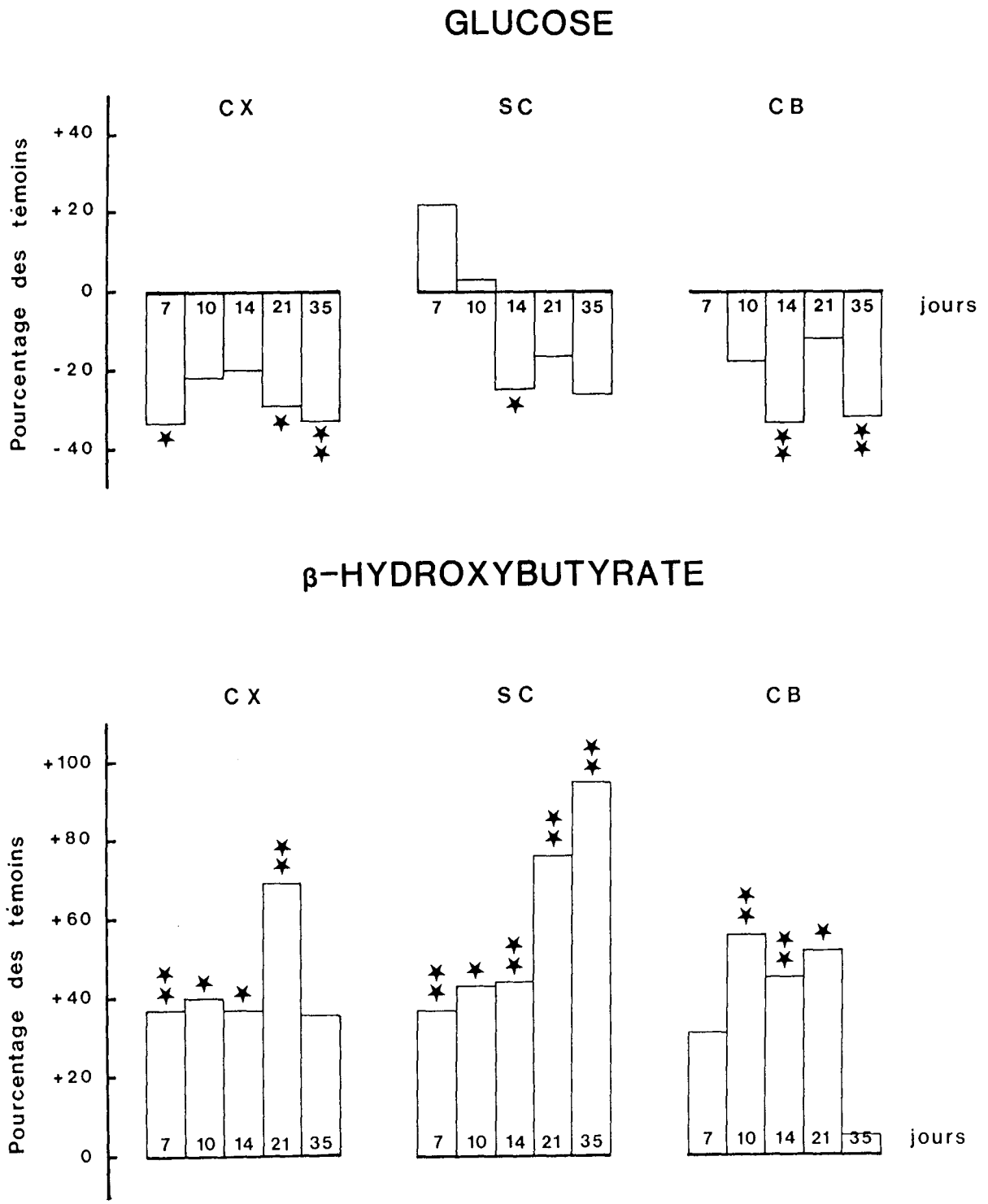


Figure 5 : Pourcentage de variation des taux d'incorporation du carbone du glucose-(2-^{14}C) et du ß-hydroxybutyrate-(3-^{14}C) dans les acides aminés cérébraux au cours du développement postnatal chez les rats traités au PhB par rapport aux témoins.
* $p < 0,05$, * * $p < 0,01$, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins (test t de Student).
Abréviations : CX : cortex cérébral ; SC : structures sous-corticales ; CB : cervelet.

5.1.2. Influence d'un traitement précoce au phénobarbital sur la répartition de la radioactivité dans les trois fractions de l'extrait acido-soluble cérébral

L'administration précoce de PhB induit une diminution significative de 24 à 36 % de l'incorporation du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux entre 7 et 14 jours après la naissance dans les trois structures cérébrales étudiées ($p < 0,05$, test t de Student). La figure 4 représente les valeurs obtenues dans le cortex cérébral. Chez les animaux traités au PhB, la radioactivité restant sur la fraction du glucose est significativement plus élevée et la radioactivité des acides aminés est significativement diminuée à 7, 10 et 14 jours après la naissance par rapport aux témoins. Par contre, à 21 et 35 jours, la répartition de la radioactivité du glucose-(2-^{14}C) dans les trois fractions de l'extrait acido-soluble n'est pas affectée par l'administration de PhB (figure 4).

5.2. Incorporation du carbone du glucose-(2-^{14}C) dans les acides aminés cérébraux : effets du phénobarbital

L'étude de la biosynthèse des acides aminés à partir du glucose montre que la radioactivité totale des quatre acides aminés (glutamate, glutamine, aspartate et GABA) exprimée en dpm/g de tissu augmente au cours du développement postnatal dans les trois structures cérébrales étudiées et dans les deux groupes d'animaux (Mémoires A et C). Ces résultats sont en accord avec l'apparition de l'incorporation rapide du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux entre le 10e et le 15e jour de vie postnatale chez le rat (Gaitonde et Richter, 1966).

Comme l'indique la figure 5, l'administration précoce de PhB induit une diminution de la biosynthèse des acides aminés cérébraux à partir du glucose : la radioactivité totale incorporée dans ces acides aminés est réduite à tous les stades étudiés dans le cortex cérébral, à partir du 14e jour dans les structures sous-corticales et du 10e jour dans le cervelet.

Dans le cortex cérébral des animaux traités au PhB, la diminution du marquage atteint 20 à 33 % de la valeur obtenue chez les témoins et est significative à 7, 21 ($p < 0,01$) et 35 jours ($p < 0,05$, test t de Student). Dans les structures sous-corticales, le taux de biosynthèse des acides aminés cérébraux est réduit de 17 à 26 % à partir du 14e jour chez les animaux traités par rapport aux témoins, la différence étant significative uniquement à 14 jours ($p < 0,05$). Dans le cervelet, à 7 et 10 jours, aucune différence n'apparaît entre les deux groupes d'animaux. A partir du 14e jour, la radioactivité des acides aminés du cervelet est réduite de 12 à 34 % chez les animaux traités par rapport aux témoins. Cette diminution est significative à 14 et 35 jours ($p < 0,01$).

5.3. Incorporation du carbone du ß-hydroxybutyrate-(3-^{14}C) dans les acides aminés cérébraux : effets du phénobarbital

5.3.1. Evolution postnatale chez les animaux témoins

Chez les témoins, l'étude de la biosynthèse des acides aminés à partir du ßHB montre qu'après l'injection du traceur, la radioactivité totale des quatre acides aminés (glutamate, glutamine, aspartate et GABA) augmente entre 7 et 14 jours puis diminue à partir du sevrage dans le cortex cérébral et les structures sous-corticales pour atteindre des valeurs faibles à 35 jours. Dans le cervelet, la somme des radioactivités ne varie pas entre 7 et 21 jours puis diminue à 35 jours (Mémoires B et C). L'évolution des taux d'incorporation du carbone du ßHB dans les acides aminés est similaire à l'évolution des concentrations circulantes de composés cétoniques : celles-ci sont élevées jusqu'à 14 jours puis diminuent au moment du sevrage.

Dans le cerveau mature, les acides aminés sont marqués rapidement après l'administration de glucose-(U-^{14}C) ou de glucose-(2-^{14}C) (Cremer, 1971 ; Van den Berg et Coll., 1969 ; Vrba et Coll., 1962). Par contre, l'incorporation du carbone du glucose dans les acides aminés dicarboxyliques cérébraux est très faible chez le rat et la souris au début du développement postnatal (Gaitonde et Richter, 1966 ; Van den Berg, 1970). Pourtant, les concentrations cérébrales de glutamate chez

le jeune rat représentent environ 50 % de celles observées chez l'adulte, suggérant que cet acide aminé dérive, en partie du moins, d'un précurseur autre que le glucose. En effet, le ßHB est un précurseur important de la biosynthèse du glutamate chez le rat nouveau-né (DeVivo et Coll., 1973). C'est un substrat métaboliquement plus accessible au cycle de Krebs que le glucose. En effet, à cette période du développement, la phosphorylation du glucose ne représente environ que le dixième du taux de l'adulte (Moore et Coll., 1971). DeVivo et Coll. (1975) ont étudié l'incorporation du ßHB-(3-^{14}C) et du glucose-(2-^{14}C) dans les acides aminés cérébraux chez le jeune rat de la naissance à 21 jours et montrent que le ßHB-(3-^{14}C) est un précurseur plus actif de la biosynthèse des acides aminés cérébraux que le glucose-(2-^{14}C) jusqu'au 15e jour de vie postnatale.

5.3.2. Effets du phénobarbital

Une administration précoce de PhB induit une augmentation de la radioactivité totale des acides aminés au cours du développement postnatal dans les trois structures cérébrales étudiées (figure 5). Dans le cortex cérébral des animaux traités au PhB, la biosynthèse des acides aminés est augmentée de 36 à 69 % à tous les stades étudiés par rapport aux témoins. Les différences observées sont significatives sauf à 35 jours ($p < 0,05$ ou $p < 0,01$, test t de Student). Dans les structures sous-corticales, le PhB induit une augmentation significative de 37 à 44 % de la radioactivité des acides aminés à 7 et 14 jours ($p < 0,01$) et à 10 jours ($p < 0,05$) ainsi qu'une augmentation de 76 et 95 % à 21 et 35 jours respectivement ($p < 0,01$). Dans le cervelet, l'augmentation du marquage des acides aminés varie de 31 à 56 % entre 7 et 21 jours après la naissance et est significative à 10, 14 ($p < 0,01$) et 21 jours ($p < 0,05$). A 35 jours, les valeurs observées dans les deux groupes d'animaux sont identiques.

6. FACTEURS REGULANT L'UTILISATION DU GLUCOSE ET DES COMPOSES CETONIQUES DANS LE CERVEAU EN DEVELOPPEMENT

6.1. Utilisation des composés cétoniques par le cerveau

Owen et Coll. (1967) ont les premiers mis en évidence la capacité du cerveau à utiliser les composés cétoniques chez des hommes adultes, traités contre l'obésité par un jeûne complet et prolongé. Des études ultérieures ont montré que chez l'homme et le rat, le prélèvement des composés cétoniques par le cerveau est directement lié à la concentration artérielle de ces substances et varie en fonction de l'âge (Girard et Ferré, 1982). De plus, pour une concentration artérielle donnée de ßHB et d'ACA, la capacité du cerveau à prélever et à oxyder les composés cétoniques est 3 à 5 fois plus élevée chez le rat en allaitement, le nouveau-né humain et l'enfant que chez l'adulte (Dahlquist et Persson, 1976 ; Hawkins et Coll, 1971 ; Kraus et Coll., 1974 ; Persson et Coll., 1972). Hawkins et Coll. (1971) montrent que jusqu'à 70 % des besoins énergétiques du cerveau de rat immature peuvent provenir de l'oxydation des composés cétoniques. On observe une évolution inverse pour le glucose : le taux de prélèvement du glucose par le cerveau est plus faible chez le jeune rat que chez l'adulte (Cremer et Coll., 1976 ; Moore et Coll., 1976).

6.2. Régulation de l'utilisation des composés cétoniques dans le cerveau adulte

Dans le cerveau adulte, le contrôle de l'utilisation des composés cétoniques se produit par un mécanisme de régulation simple comprenant la concentration circulante en substrat (Daniel et Coll., 1971) et le degré de saturation des enzymes de l'utilisation de ces composés (Sokoloff et Coll., 1977a). En ce qui concerne le transport de ces substances du sang vers le cerveau, celui-ci augmente pendant la période d'allaitement ainsi que chez l'adulte au cours du jeûne ou de régimes riches en graisses (Gjedde et Crone, 1975 ; Moore et Coll., 1976 ; Pollay et Stevens, 1980). Ces auteurs mettent en évidence une induction des systèmes de transport dans les cétoses d'origine nutritionnelle dans

le cerveau immature et adulte, suggérant que la membrane plasmique serait un site potentiel de régulation de l'utilisation des composés cétoniques par le cerveau (Robinson et Williamson, 1980).

6.3. Régulation de l'utilisation des composés cétoniques dans le cerveau en développement

Par contre, la régulation de l'utilisation des composés cétoniques au cours du développement postnatal est plus complexe. Il existe bien une régulation par la concentration en substrat (Hawkins et Coll., 1971 ; Krebs et Coll., 1971) mais également par les enzymes impliquées dans le métabolisme de ces substances dont les taux varient de manière importante pendant la maturation postnatale (Page et Coll., 1971).

Avant le sevrage, le foie a une activité de biosynthèse des composés cétoniques élevée qui est responsable de l'hypercétonémie (Drahota et Coll., 1964 ; Foster et Bailey, 1976 ; Lockwood et Bailey, 1970). Dans le foie, les précurseurs physiologiques majeurs des composés cétoniques sont les acides gras à longue chaîne dérivés des triacylglycérols du tissu adipeux. Le prélèvement des acides gras non estérifiés par le foie dépend de leur concentration, si bien que la régulation de la lipolyse est un facteur important déterminant le taux de cétogénèse (Hales et Coll., 1978). La lipolyse du tissu adipeux est sensible à des variations des concentrations en hormones, en particulier le glucagon et l'insuline. Ces hormones, en augmentant les concentrations en AMPc, auraient une action sur la disponibilité des longues chaînes d'acyl-CoA entre les voies d'estérification et de ß-oxydation (Benito et Coll., 1979 ; Cole et Margoris, 1974 ; Heimberg et Coll., 1969 ; Klausner et Coll., 1978 ; Williamson, 1979).

Il a également été montré que les composés cétoniques peuvent inhiber la lipolyse du tissu adipeux, soit par une action directe (Bjorntorp, 1966), soit indirectement par une stimulation de la sécrétion d'insuline (Madison et Coll., 1964) permettant ainsi un rétrocontrôle des composés cétoniques sur leur propre formation (Williamson, 1979).

6.4. Facteurs contrôlant l'utilisation relative du glucose et des composés cétoniques par le cerveau en développement

Tout d'abord, considérons l'activité des enzymes-clé directement impliquées dans la conversion de ces substrats en acétyl-CoA. En effet, la majeure partie de l'ATP généré par le cerveau provient de l'oxydation de l'acétyl-CoA par le cycle de Krebs. L'acétyl-CoA provenant du métabolisme du glucose est formé par décarboxylation du pyruvate par la pyruvate déshydrogénase. La formation d'acétyl-CoA à partir des composés cétoniques fait intervenir trois enzymes, la ß-hydroxybutyrate déshydrogénase, la 3-cétoacide-CoA transférase et l'acétoacétyl-CoA thiolase. Dans le cerveau adulte, l'activité de ces enzymes est similaire (Williamson, 1975). Une différence importante concernant leurs caractéristiques est que les enzymes du métabolisme des composés cétoniques catalysent des réactions réversibles. Les composés cétoniques ont un rôle de "tampon", permettant ainsi de maintenir les concentrations en acétyl-CoA nécessaires au fonctionnement du cycle de Krebs (Williamson et Hems, 1970). De plus, un facteur important régulant les quantités d'acétyl-CoA produits à partir du glucose ou des composés cétoniques est d'une part l'inhibition de la pyruvate déshydrogénase par l'acétyl-CoA. En effet, Olson et Coll. (1978) proposent que l'augmentation du rapport acétyl-CoA/CoA serait à l'origine de l'inhibition de la pyruvate déshydrogénase. D'autre part, l'augmentation des concentrations en citrate serait responsable de l'inhibition de la phosphofructokinase (Robinson et Williamson, 1980).

Dans le cerveau adulte, l'activité de la pyruvate déshydrogénase représente environ 10 % de l'activité des autres enzymes régulant le métabolisme du glucose, c'est-à-dire l'hexokinase et la phosphofructokinase. Comme la conversion d'une molécule de glucose en lactate ne produit qu'une seule molécule d'ATP par triose, en terme d'apport énergétique, c'est la quantité de carbone du glucose entrant dans le cycle de Krebs qui est plus importante que le taux de glycolyse. La mesure des activités relatives de la pyruvate déshydrogénase et des enzymes du métabolisme des composés cétoniques montre des variations au cours du développement postnatal qui sont en faveur de l'utilisation des

composés cétoniques plutôt que du glucose pendant la période postnatale. Cette tendance s'inverse avec la maturation (Cremer et Heath, 1974 ; Middleton, 1973 ; Page et Coll., 1971 ; Stumpf et Kraus, 1979). Le rapport des activités de l'acétoacétyl-CoA thiolase sur la pyruvate déshydrogénase varie de 5,2 à 9,0 chez le rat de la naissance au 25e jour postnatal alors que chez l'adulte, ce rapport est de 1,8 (Stumpf et Kraus, 1979).

En effet, il apparaît que la capacité limitée du cerveau immature à oxyder le glucose est liée à la maturation de l'activité de la pyruvate déshydrogénase. Celle-ci est très faible à la naissance et augmente pendant la période postnatale, en particulier à partir du 15e jour postnatal pour atteindre les valeurs de l'adulte à 30 jours (Booth et Coll., 1980 ; Cremer et Teal, 1974 ; Land et Coll., 1977 ; Stumpf et Kraus, 1979). Stumpf et Kraus (1979) suggèrent que l'étape limitante de l'oxydation du glucose se situerait principalement au niveau de la pyruvate déshydrogénase mais également au niveau de la phosphofructokinase qui serait inhibée par les concentrations élevées en citrate du cerveau immature. De même, l'hexokinase a une activité ne représentant que 40 % de celle de l'adulte chez le rat âgé de 5 jours puis celle-ci augmente pendant le développement, en particulier à partir du 15e jour postnatal (Booth et Coll., 1980 ; Land et Coll., 1977).

Par contre, dans le cerveau immature, l'activité des enzymes de l'utilisation des composés cétoniques semble ajustée au taux de substrat disponible. Ces enzymes présentent une évolution unique : l'activité de la ß-hydroxybutyrate déshydrogénase et de la 3-cétoacide-CoA transférase augmente rapidement jusqu'au 25e jour après la naissance ; à ce stade l'activité de ces enzymes représente 4 à 5 fois celle de l'adulte puis diminue pour atteindre les taux de l'adulte (Booth et Coll., 1980 ; Dahlquist et Coll., 1972 ; Klee et Sokoloff, 1967 ; Krebs et Coll., 1971 ; Page et Coll., 1971). L'activité de l'acétoacétyl-CoA thiolase est maximale à la naissance, reste constante pendant les 30 premiers jours de vie et diminue ensuite pour atteindre à l'âge adulte les 2/3 de la valeur observée au cours du développement (Krebs et Coll., 1971).

Il apparaît donc, que s'ils sont disponibles, les composés cétoniques contribuent pour une part plus importante au métabolisme énergétique cérébral chez l'animal en développement que chez l'adulte. De plus, dans le cerveau immature, l'équilibre hormonal et l'équilibre des différents substrats sont tels que les composés cétoniques sont disponibles en permanence. Bien qu'il existe certainement des sites intracérébraux de contrôle de l'utilisation du glucose et des composés cétoniques, il semble que les sites primaires se situeraient plutôt au niveau du foie, organe contrôlant la libération de ces substances (Williamson, 1975).

De plus, il a été montré que l'utilisation du glucose par le cerveau est inhibée par les composés cétoniques (Itoh et Quastel, 1970 ; Miller et Coll., 1982a ; Ruderman et Coll., 1974). Miller et Coll. (1982a) ont étudié l'activité de certaines enzymes du métabolisme du glucose et montrent que la phosphofructokinase et la pyruvate déshydrogénase sont affectées par une augmentation de l'utilisation cérébrale des composés cétoniques. Il semble y avoir deux mécanismes principaux par lesquels le cerveau maintient sa consommation d'oxygène et sa production d'énergie à des valeurs constantes au cours de l'hypercétonémie : la réduction du taux de glycolyse et l'augmentation de la libération de lactate par le cerveau dans le sang (Miller, 1986).

De même, une étude régionale de l'utilisation du ßHB et du glucose par le cerveau de rat de 22 jours, utilisant le D-ßHB-(3-^{14}C) et le fluorodésoxyglucose-(^{3}H) montre qu'au cours de l'hypercétonémie, lorsque les taux régionaux d'utilisation du ßHB augmentent, on observe une diminution de l'utilisation régionale de glucose suffisante pour maintenir la consommation d'oxygène à des valeurs constantes (Miller, 1986).

7. MODE D'ACTION POSSIBLE DU PHENOBARBITAL SUR LE METABOLISME ENERGETIQUE CEREBRAL

Une administration précoce de PhB induit une diminution de l'incorporation du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux et une augmentation simultanée de l'utilisation du ßHB comme précurseur de la biosynthèse de ces acides aminés. Ces résultats montrent que le PhB est capable d'induire des perturbations de l'équilibre de la balance énergétique cérébrale, c'est-à-dire un déséquilibre dans les taux relatifs d'utilisation des deux principaux substrats du métabolisme énergétique du cerveau de rat en développement. Patel (1979) suggère qu'une altération de l'utilisation relative du glucose et/ou des composés cétoniques dans le cerveau immature pourrait contribuer à des altérations de la fonction cérébrale. Cependant, dans la plupart des études aucune corrélation n'a été établie entre les dommages cérébraux induits par un déséquilibre endocrinien ou nutritionnel et des altérations du métabolisme des composés cétoniques (Patel, 1979).

L'augmentation des taux d'utilisation cérébrale de ßHB observée chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins est certainement en grande partie le reflet des teneurs du sang en composés cétoniques plus élevées chez ces animaux que chez les témoins. En effet, il a été montré que le prélèvement des composés cétoniques par le cerveau est directement lié à la concentration artérielle de ces substrats (Daniel et Coll., 1971 ; Hawkins et Coll., 1971 ; Robinson et Williamson, 1980). De plus, il semble que les sites principaux de régulation de l'utilisation des composés cétoniques dans le cerveau en développement soient au niveau du foie qui libère ces substances (Williamson, 1975). Comme nous l'avons discuté dans le paragraphe 4 , le PhB est un puissant inducteur des enzymes hépatiques et l'augmentation des concentrations circulantes en composés cétoniques chez les animaux traités au PhB est certainement le reflet d'une augmentation de l'activité biosynthétique au niveau du foie chez ces animaux par rapport aux témoins.

Le transport des composés cétoniques du sang vers le cerveau pourrait également être un site de régulation de l'utilisation de ces substances par le cerveau comme l'ont suggéré Robinson et Williamson (1980). L'induction des systèmes de transport des composés cétoniques au niveau cérébral semble directement liée à l'augmentation des concentrations circulantes de ces composés au cours de cétoses d'origine nutritionnelle chez l'animal ou l'homme jeune comme chez l'adulte (Gjedde et Crone, 1975 ; Hawkins et Coll., 1971 ; Moore et Coll., 1976 ; Page et Williamson, 1971). De plus, chez l'animal immature la perméabilité cérébrale au ßHB est étroitement liée aux taux des enzymes cérébrales du métabolisme des composés cétoniques (Moore et Coll., 1976).

Le PhB pourrait modifier les paramètres du transport du ßHB de manière indirecte, soit par l'augmentation des concentrations circulantes de ßHB, soit par l'induction possible des enzymes cérébrales impliquées dans le métabolisme des composés cétoniques. Cependant, il existe peu d'études concernant les effets du PhB sur l'activité des enzymes cérébrales. Ghersi-Egea et Coll. (1987a, 1987b) montrent dans le cerveau de rat adulte une induction modérée du cytochrome P450 microsomal ainsi que de la γ-glutamyltransférase dans les microvaisseaux cérébraux après une exposition chronique au PhB pendant 5 jours à la dose de 180 mg/kg. L'activité de la γ-glutamyltransférase dans les membranes synaptiques n'est pas augmentée après un tel traitement. De plus, une étude concernant les enzymes cérébrales impliquées dans la biosynthèse de l'hème montre que contrairement à ce qui se passe dans le foie, leurs activités ne semblent pas affectées par un traitement au PhB (Percy et Shanley, 1979). A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée chez l'animal immature. Cependant, il semble que l'inductibilité des enzymes cérébrales par des agents pharmacologiques comme le PhB soit relativement faible ou inexistante, en tous cas chez l'adulte.

Le PhB pourrait agir directement sur le système de transport des composés cétoniques du sang vers le cerveau et augmenter la perméabilité membranaire de ces substances facilitant ainsi leur utilisation dans le

cerveau. La mesure dans notre laboratoire des différences artério-veineuses de ßHB au cours d'un traitement chronique précoce au PhB identique à celui de la présente étude a permis de montrer chez les rats traités au PhB, une augmentation importante du prélèvement cérébral de ßHB à 14 et 21 jours par rapport aux témoins. De plus, contrairement à ce qui se passe chez les témoins, il n'y a aucune corrélation significative entre la concentration artérielle de ßHB et les différences artério-veineuses de ce composé à 10, 14 et 21 jours. Ces résultats suggèrent que le PhB semble capable de modifier les propriétés des systèmes de transport des composés cétoniques au niveau de la barrière hémato-encéphalique (Schroeder, 1989 ; article en préparation).

Les effets du PhB sur le métabolisme énergétique du cerveau en développement pourraient être en partie liés à la sous-alimentation induite par les effets sédatifs de ce médicament. En effet, la sous-alimentation en période néonatale induit chez le rat de 22 jours une augmentation des concentrations circulantes de ßHB et d'ACA respectivement de 60 et 50 % et une diminution de la glycémie de 35 % (Escriva et Coll., 1985 ; Patel et Balaz, 1975). Patel et Balazs (1975) mettent en évidence une diminution de l'incorporation du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux des rats sous-alimentés. La dépression du métabolisme du glucose dans le cerveau des animaux sous-alimentés serait compensée par une utilisation accrue des composés cétoniques présents en quantité plus importante dans le sang de ces animaux (Patel et Balaz, 1975). Cependant, bien que la sous-alimentation et le PhB induisent des effets similaires sur le métabolisme énergétique du cerveau en développement, le degré de sévérité de la sous-alimentation nécessaire pour induire des effets comparables à ceux observés au cours d'une exposition au PhB nous permet de penser que les effets du PhB sont en grande partie d'origine non nutritionnelle. En effet, Patel et Balazs (1975) observent une réduction significative du poids corporel des animaux sous-alimentés de 40 à 50 % par rapport aux témoins.

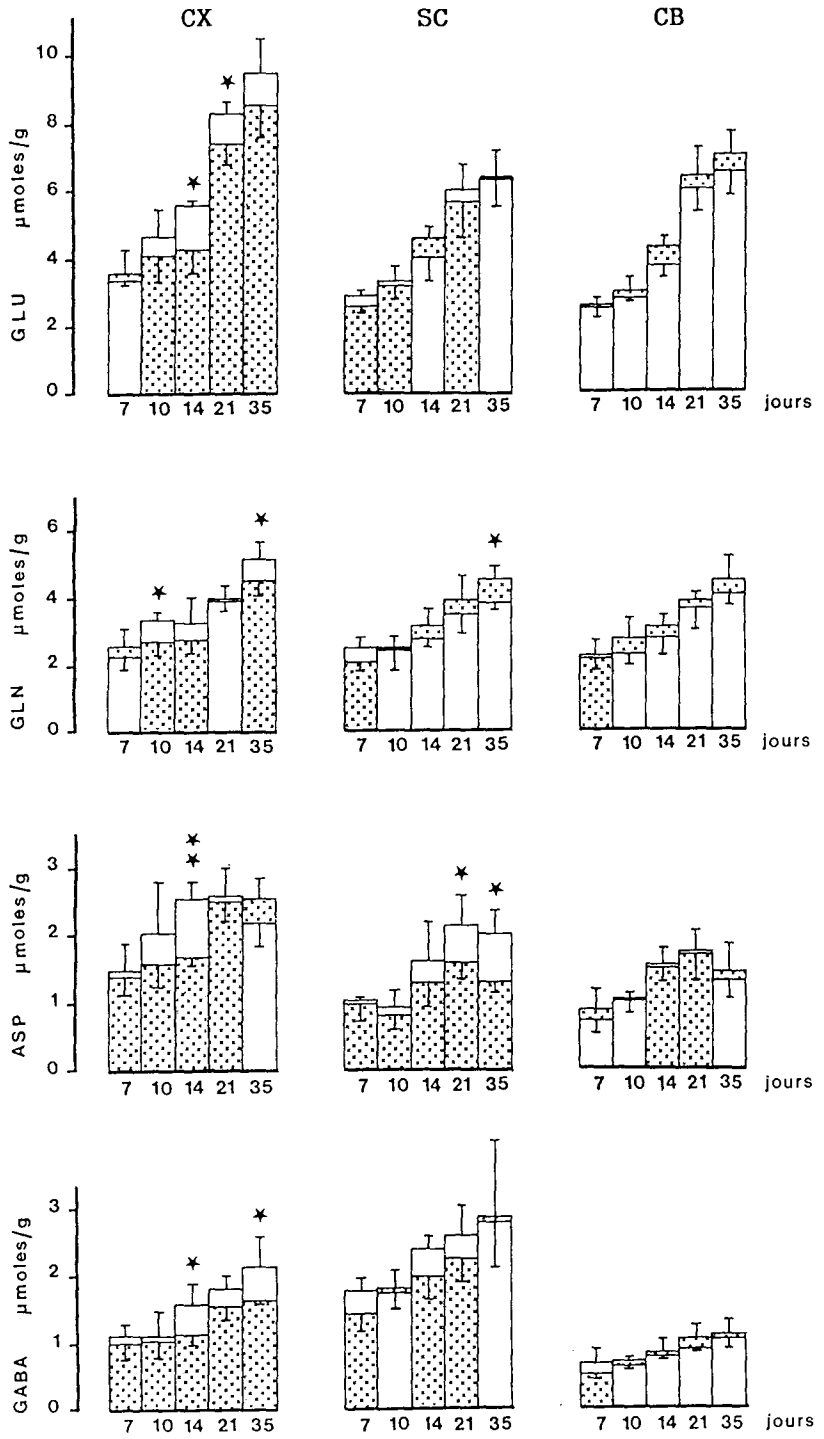


Figure 6 : Effets d'un traitement chronique précoce au PhB sur l'évolution postnatale des concentrations en acides aminés du cortex cérébral (CX), des structures sous-corticales (SC) et du cervelet (CB) du rat.
Les valeurs représentent des moyennes ± D.S. de 3 à 4 expériences.
* p 0,05, ** p 0,01, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins (test de Student).
Abréviations : GLU, glutamate ; GLN, glutamine ; ASP, aspartate.

Témoins PhB

Les effets du PhB sur l'utilisation du glucose par le cerveau en développement pourraient également être partiellement liés à l'hypothermie. Chez l'animal adulte anesthésié dont la température corporelle n'est pas contrôlée, l'hypothermie induit une diminution de l'utilisation du glucose par le cerveau (Horton, 1974) et affecte le métabolisme du glucose en diminuant le flux glycolytique (Möhler et Coll., 1975). Au contraire, après un traitement aux barbituriques, le flux de glucose n'est pas modifié chez les animaux ayant une température corporelle normale (Horton, 1974). Dans notre étude, le PhB utilisé à une dose anticonvulsivante, n'affecte pas la température corporelle des animaux et la dépression générale de l'incorporation du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux induite par le PhB est certainement en grande partie due à des effets directs du médicament non liés à l'hypothermie.

8. EFFETS DU PHENOBARBITAL SUR LES CONCENTRATIONS EN ACIDES AMINES DU CERVEAU DE RAT

Dans les deux groupes d'animaux, les teneurs cérébrales de glutamate, glutamine et GABA augmentent pendant toute la période du développement postnatal étudiée, c'est-à-dire entre 7 et 35 jours dans le cortex cérébral, les structures sous-corticales et le cervelet (figure 6). Par contre, les concentrations en aspartate augmentent uniquement jusqu'à 21 jours après la naissance. L'augmentation postnatale des teneurs cérébrales des quatre acides aminés est statistiquement significative comme le montrent les résultats de l'analyse de variance à deux facteurs (F variant de 10,48 à 93,88, $p < 0,01$).

Dès le début du développement postnatal, la répartition des acides aminés libres du cerveau dans les différentes structures est similaire à celle observée chez l'adulte. Le glutamate est prépondérant dans le cortex cérébral et le GABA est présent à la concentration la plus élevée dans les structures sous-corticales et la plus faible dans le cervelet (Agrawal et Davison, 1973 ; Kandera et Coll., 1968 ; figure 6).

8.1. Evolution postnatale chez les témoins

Dans notre étude, l'évolution postnatale des teneurs en acides aminés observée dans les trois structures cérébrales est comparable à celle précédemment étudiée dans le cerveau entier (Agrawal et Coll., 1966 ; Bayer et McMurray, 1967 ; Dravid et Jilek, 1965 ; Patel et Balazs, 1970 ; Ramirez de Guglielmone et Gomez, 1966) et dans le cortex cérébral du rat (Vernadakis et Woodbury, 1962).

Les concentrations en glutamate augmentent de manière plus importante que celles des autres acides aminés, en particulier au cours de la 3e semaine postnatale (Bayer et McMurray, 1967 ; Himwich et Petersen, 1959 ; Waelsch, 1951 ; figure 6). Bayer et McMurray (1967) montrent que la concentration cérébrale de glutamate double entre la naissance et l'âge adulte.

Les concentrations en GABA augmentent environ jusqu'à 30 jours après la naissance et plus particulièrement pendant la 2e semaine de vie postnatale (Agrawal et Coll., 1966 ; Bayer et McMurray, 1967 ; figure 6). Cependant, dans le cervelet, les concentrations en GABA sont faibles et varient peu au cours du développement postnatal (figure 6). L'augmentation des teneurs en GABA dans le cerveau en développement est bien corrélée à l'augmentation de l'activité de la glutamate décarboxylase, enzyme catalysant la formation du GABA à partir du glutamate (Bayer et McMurray, 1967 ; Sims et Pitts, 1970). De plus, pendant cette période, l'activité des enzymes du métabolisme du GABA et du cycle de Krebs atteint un taux maximal (Roberts et Coll., 1951).

La concentration en glutamine représente environ la moitié de celle du glutamate à 21 et 35 jours dans le cortex cérébral (figure 6) et chez l'adulte dans le cerveau entier (Agrawal et Coll., 1966 ; Bayer et McMurray, 1967). Les taux de glutamine augmentent au cours du développement postnatal (Agrawal et Coll., 1966 ; Vernadakis et Woodbury, 1962) et sont similaires dans les trois structures étudiées (figure 6).

L'évolution postnatale des concentrations en aspartate du cerveau est différente de celle des trois autres acides aminés : la concentration est maximale à 21 jours après la naissance puis diminue pour atteindre à 35 jours les valeurs de l'adulte (Agrawal et Coll., 1966 ; figure 6).

8.2. Effets du phénobarbital

Comme le montre l'analyse de variance à deux facteurs, un traitement chronique précoce au PhB affecte l'évolution postnatale des concentrations en glutamate ($F = 9,68$, $p < 0,01$), glutamine ($F = 4,28$, $p < 0,05$) et GABA ($F = 10,04$, $p < 0,01$) dans le cortex cérébral. Dans les structures sous-corticales, seules les concentrations en aspartate sont significativement affectées par le PhB ($F = 12,45$, $p < 0,01$). Dans le cervelet, on n'observe aucun effet du médicament sur les teneurs des différents acides aminés.

Comme le montre la figure 6, dans le cortex cérébral les concentrations en glutamate sont significativement réduites à 14 et 21 jours chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins ($p < 0,05$, test t de Student). Les concentrations en glutamine et en GABA sont également significativement diminuées respectivement à 10 et 35 jours et à 14 et 35 jours chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins ($p < 0,05$). En ce qui concerne le taux d'aspartate, le PhB induit une diminution significative à 14 jours après la naissance ($p < 0,01$).

Dans les structures sous-corticales, seules les concentrations en aspartate sont significativement réduites à 21 et 35 jours et la concentration en glutamine augmentée à 35 jours chez les rats traités au PhB par rapport aux témoins ($p < 0,05$) (figure 6).

Dans le cervelet, le PhB n'affecte pas les concentrations des quatres acides aminés quel que soit le stade du développement postnatal étudié (figure 6).

Hannah et Coll. (1989) ont étudié les effets à court et à long terme d'un traitement chronique au PhB à la dose de 10 mg/kg du 18e jour de la gestation au 21e jour postnatal sur les teneurs en acides aminés du cervelet. Contrairement aux résultats obtenus dans notre étude, ces auteurs mettent en évidence des perturbations importantes du taux des acides aminés dans cette structure. En effet, le PhB induit une augmentation à court terme des concentrations en GABA et en glutamate qui persiste chez le rat adulte, 5 semaines après l'arrêt du traitement ainsi qu'une augmentation transitoire à 21 jours des teneurs en aspartate du cervelet.

Chez le rat adulte, Aoki et Kuroiwa (1982) observent une diminution des taux de glutamate, aspartate et GABA dans le cortex cérébral des animaux traités au PhB pendant 35 jours alors que dans le cervelet seul le glutamate est significativement affecté par le traitement au PhB. Dans cette étude, les taux plasmatiques de PhB sont relativement élevés et varient de 100 à 200 µg/ml. Par contre, un traitement à 60 mg/kg chez le rat adulte pendant 10 jours n'affecte pas les teneurs en glutamate du cortex cérébral et du cervelet, mais les concentrations en GABA sont augmentées dans toutes les structures cérébrales et particulièrement dans le cortex cérébral (Patsalos et Lascelles, 1981).

En conclusion, une exposition chronique précoce au PhB n'affecte pas l'évolution postnatale des concentrations de glutamate, glutamine, aspartate et GABA dans les structures sous-corticales et le cervelet. Cependant, un tel traitement induit dans le cortex cérébral, une diminution des concentrations en glutamate à 10 et 14 jours et en glutamine et GABA à 10, 14 et 35 jours après la naissance.

9. CONCLUSION : EFFETS DU PHENOBARBITAL SUR LA MATURATION BIOCHIMIQUE DU CERVEAU DE RAT EN DEVELOPPEMENT

Une administration chronique précoce de PhB induit une dépression générale de l'utilisation du glucose qui se traduit par une diminution de la radioactivité totale incorporée dans les acides aminés cérébraux après l'injection de glucose-(2-^{14}C). Cependant, un tel traitement induit une augmentation significative de l'incorporation du carbone du ßHB-(3-^{14}C) dans ces acides aminés montrant que chez les animaux traités au PhB, le ßHB est un précurseur plus actif de la biosynthèse des acides aminés cérébraux que chez les témoins. L'augmentation de la radioactivité totale des acides aminés après l'injection de ßHB-(3-^{14}C) observée chez les animaux traités au PhB est certainement en grande partie le reflet des teneurs en composés cétoniques du sang plus élevées que chez les animaux témoins. L'augmentation des concentrations circulantes de ßHB et d'ACA pourrait-être due à une biosynthèse accrue de ces composés au niveau du foie : en effet, le PhB est un puissant inducteur des enzymes microsomales hépatiques.

Il apparaît qu'une exposition précoce au PhB est capable d'induire une modification de l'équilibre de la balance énergétique cérébrale. Cependant, un tel traitement n'a que peu de conséquences sur l'évolution postnatale des concentrations en acides aminés du cerveau de rat en développement.

Les effets du PhB sur le métabolisme énergétique cérébral pourraient être en partie liés, soit à une sous-alimentation consécutive aux effets sédatifs de ce médicament, en particulier au début du traitement, soit à une hypothermie. Cependant, il semble que ces deux facteurs n'aient que peu d'influence sur les effets du PhB sur la maturation du métabolisme énergétique cérébral et que ceux-ci seraient certainement en grande partie des effets directs du médicament.

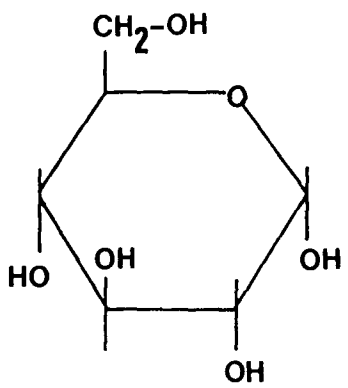
CHAPITRE 2

Effets à court et à long terme du phénobarbital sur l'utilisation cérébrale locale de glucose (mémoires D, E, F)

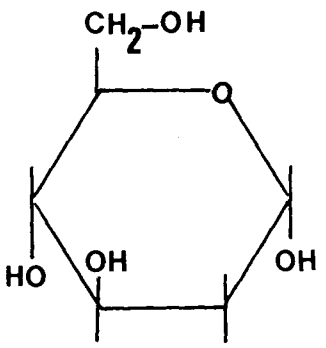
1.THEORIE DE LA METHODE AUTORADIOGRAPHIQUE QUANTITATIVE AU 2-DESOXYGLUCOSE

Le cerveau est un organe complexe et hétérogène constitué de nombreux composants anatomiques et fonctionnels ayant des niveaux d'activité très différents qui peuvent varier indépendamment avec le temps ou leur fonction propre. Avant la mise au point des méthodes d'autoradiographie quantitative, les méthodes d'études du métabolisme énergétique in vivo ne permettaient que des mesures des taux moyens dans le cerveau entier (Gjedde et Coll., 1975 ; Kety et Schmidt, 1948 ; Lassen et Munck, 1955). Ces méthodes ont permis de montrer des variations des taux de métabolisme cérébral associées à des altérations importantes du fonctionnement cérébral ou de la structure telles que par exemple, le développement postnatal, le vieillissement, l'anesthésie ou les états convulsifs (Kety, 1950, 1957 ; Lassen, 1959 ; Sokoloff, 1960, 1976). Ces méthodes n'ont pas permis de détecter des modifications du métabolisme cérébral dans un certain nombre de conditions dans lesquelles se produisent des altérations plus subtiles de l'activité fonctionnelle cérébrale comme le sommeil profond à ondes lentes, la sédation, la schizophrénie (Kety, 1950 ; Lassen, 1959 ; Sokoloff, 1969). L'absence de changement apparent peut s'expliquer soit par une redistribution au niveau local de l'activité métabolique et fonctionnelle, sans modification du taux moyen de métabolisme du cerveau entier, soit par la limitation de l'altération de l'activité métabolique à des régions trop petites pour être détectées par ces méthodes.

La mise au point de nouvelles méthodes permettant la mesure des taux de métabolisme énergétique dans des régions spécifiques du cerveau devenait indispensable. Kety et ses collaborateurs (Kety, 1960 ; Freygang et Sokoloff, 1958 ; Landau et Coll., 1955) ont développé une technique autoradiographique quantitative de mesure des concentrations tissulaires locales de traceurs radioactifs diffusibles et chimiquement inertes afin de déterminer les taux de débit sanguin simultanément dans toutes les structures visibles et identifiables sur des autoradiogrammes de coupes sériées du cerveau.



GLUCOSE



2-DESOXYGLUCOSE

Figure 1 : Formules chimiques du glucose et du 2-désoxyglucose

L'application de cette technique d'autoradiographie quantitative à la détermination des taux locaux de métabolisme a présenté un certain nombre de difficultés en raison de l'impossibilité d'utiliser des formes marquées des substrats normaux du métabolisme énergétique cérébral : l'oxygène et le glucose. Les radioisotopes de l'oxygène ont une demi-vie trop courte. De plus, l'oxygène et le glucose sont tout deux convertis très rapidement en CO_2 qui va quitter le tissu cérébral (Sacks, 1957). L'utilisation du 2-désoxyglucose-(^{14}C) (2DG-(^{14}C)), un analogue marqué du glucose qui présente des propriétés particulières, a permis la mesure de l'utilisation cérébrale locale de glucose par autoradiographie quantitative. Le 2DG est métabolisé par une partie de la voie d'utilisation du glucose à une vitesse définissable par rapport à celle du glucose. Cependant, le 2DG-6-phosphate (2DG-6P) formé est emprisonné dans les tissus permettant ainsi l'application de la méthode autoradiographique quantitative.

1.1. Bases théoriques de la méthode au 2-désoxyglucose

1.1.1. Propriétés biochimiques du 2-désoxyglucose

Le 2DG ne diffère du glucose que par le remplacement du groupe hydroxyle du second atome de carbone par un atome d'hydrogène (figure 1). Cette seule différence structurale est responsable des propriétés chimiques du 2DG qui le rendent tout à fait adapté à la mesure quantitative des taux d'utilisation de glucose. En effet, il est métabolisé comme le glucose jusqu'au moment où il atteint une étape de la glycolyse où sa structure empêche son métabolisme ultérieur. Ainsi, le 2DG est transporté entre le sang et le tissu par le même système de transport saturable que le glucose (Bachelard, 1971 ; Horton et Coll., 1973). Dans les tissus, il entre en compétition avec le glucose pour l'hexokinase qui phosphoryle ces deux substrats en leurs hexoses-6-phosphate respectifs (Sols et Crane, 1954). Le glucose-6-phosphate (glucose-6P) est converti en fructose-6P et métabolisé ensuite par la voie de la glycolyse et du cycle des acides tricarboxyliques. Par contre, le 2DG-6P ne peut être isomérisé en fructose-6P en raison de l'absence du groupement hydroxyle sur le second atome de carbone et son

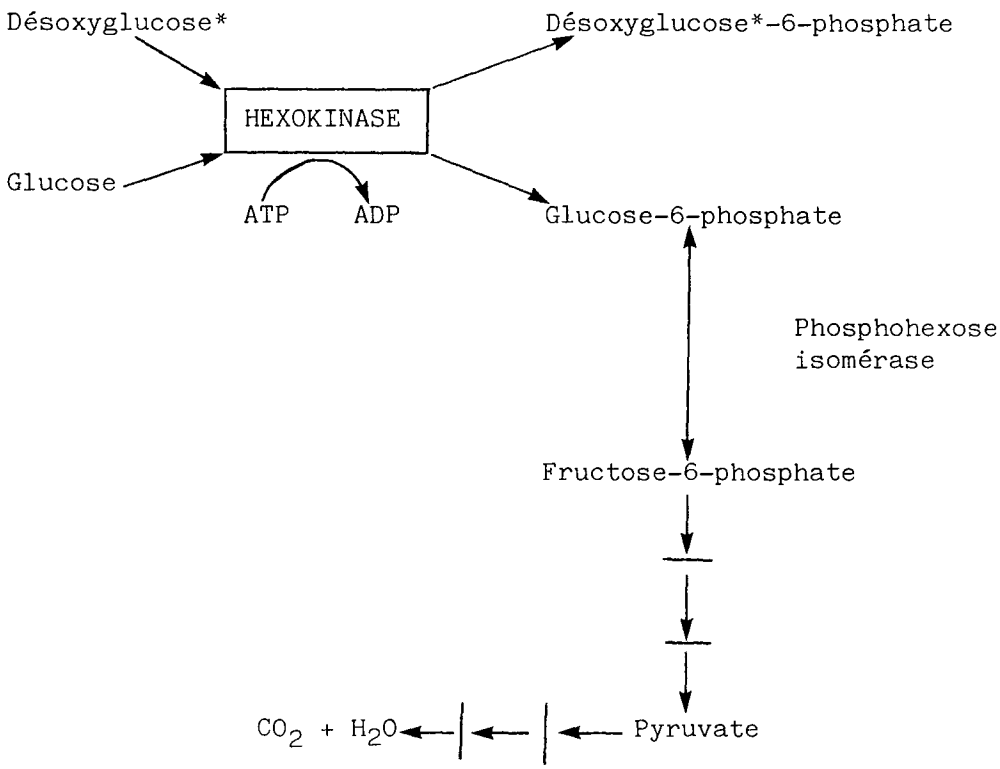


Figure 2 : Propriétés biochimiques du 2-désoxyglucose dans le cerveau.

métabolisme cesse à ce point (Bachelard et Coll., 1971 ; Horton et Coll., 1973 ; Sol et Crane, 1954) (figure 2). Cependant, bien que le 2DG ne soit pas un substrat pour la phosphohexose isomérase, le 2DG a une certaine affinité pour cette enzyme et lorsqu'il est présent en concentration suffisante, peut inhiber compétitivement le métabolisme du glucose-6P (Horton et Coll., 1973 ; Wick et Coll., 1957). C'est probablement par l'inhibition compétitive à l'étape de la phosphohexose isomérase que des doses pharmacologiques de 2DG provoquent une inhibition de la glycolyse responsable d'un syndrome clinique voisin de celui du coma hypoglycémique (Horton et Coll., 1973 ; Tower, 1958).

Il existe des voies alternatives du métabolisme du glucose-6P mais elles ne semblent pas avoir une influence significative sur le devenir du 2DG-6P dans le cerveau. Le glucose-6P peut être oxydé par la glucose-6-phosphate déshydrogénase, première enzyme du shunt des pentoses-phosphate mais le 2DG-6P n'est pas un substrat pour cette enzyme (Horton et Coll., 1973 ; Sols et Crane, 1954 ; Tower, 1958). Le glucose-6P peut également être hydrolysé par la glucose-6-phosphatase en glucose. L'activité de cette enzyme est très faible dans le cerveau de mammifère (Hers et DeDuve, 1950 ; Raggi et Coll., 1960). L'influence possible de cette enzyme sur la méthode au 2-désoxyglucose sera discutée plus en détail ultérieurement.

1.1.2. Description du modèle théorique

Les bases théoriques de la méthode sont dérivées de l'analyse du modèle du comportement biochimique du 2DG dans le cerveau (figure 3). Le glucose et le 2DG-(^{14}C) présents dans le plasma entrent en compétition pour un transporteur commun au niveau de la barrière hémato-encéphalique. Le glucose et le 2DG-(^{14}C) pénètrent dans un pool de précurseur commun dans lequel ils entrent en compétition soit pour le transporteur de sortie, soit pour l'hexokinase qui les phosphoryle respectivement en glucose-6P et en 2DG-6P-(^{14}C). La réaction de l'hexokinase est irréversible et le 2DG-6P-(^{14}C) qui n'est pas un substrat adéquat pour les autres enzymes, s'accumule dans le tissu alors

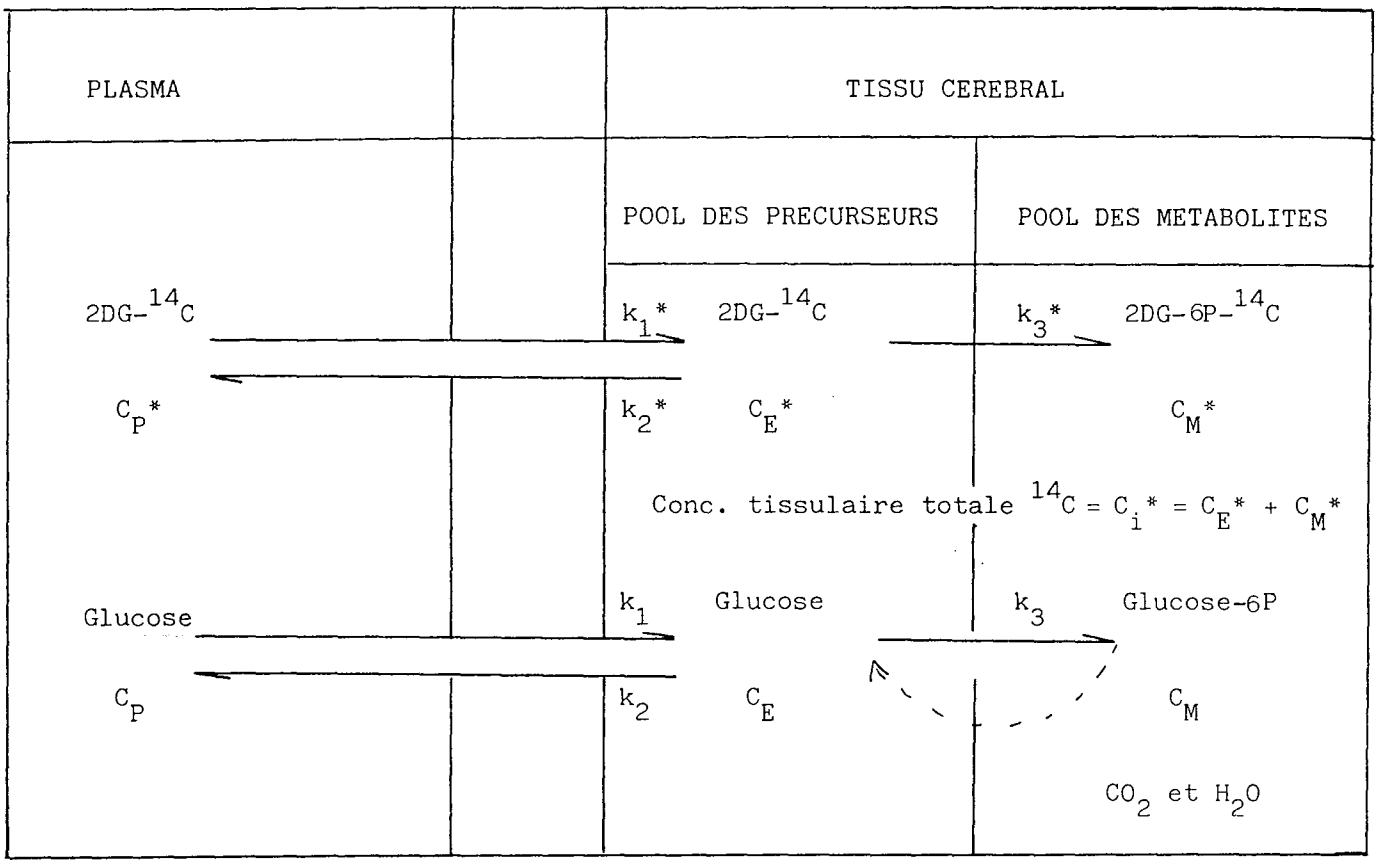


Figure 3 : Représentation du modèle théorique. C_i^* représente la concentration totale de ^{14}C dans un compartiment homogène ; C_p^* et C_p représentent respectivement les concentrations de 2-DG-(^{14}C) et de glucose dans le plasma artériel ; C_E^* et C_E représentent leurs concentrations respectives dans le pool tissulaire servant de substrat pour l'hexokinase. C_M^* représente la concentration tissulaire de 2DG-6P-(^{14}C). Les constantes k_1^*, k_2^* et k_3^* représentent respectivement les constantes de transport du 2DG-(^{14}C) du plasma vers le tissu et du tissu vers le plasma et la phosphorylation par l'hexokinase. k_1, k_2 et k_3 représentent les constantes pour le glucose. Le glucose et le 2DG-(^{14}C) entrent en compétition pour le transporteur et pour l'hexokinase qui les phosphoryle en leur hexose-6-phosphate respectif. Les flèches en pointillés représentent l'hydrolyse possible du glucose-6P par la glucose-6-phosphatase (Sokoloff et Coll., 1977b).

que le glucose-6P est métabolisé en CO_2 et H_2O. Le modèle tient également compte du fait qu'une partie du glucose-6P peut être hydrolysée en glucose par la glucose-6-phosphatase.

Cependant, l'application de ce modèle à la quantification de l'utilisation cérébrale locale de glucose dépend de la validité de plusieurs hypothèses :

1. Le modèle est applicable uniquement à une région localisée du tissu nerveux dans laquelle un certain nombre de facteurs sont homogènes : le débit sanguin, les taux de transport du glucose et du 2DG-(^{14}C) entre le plasma et le tissu, les concentrations de 2DG-(^{14}C), de glucose, de 2DG-6P-(^{14}C) et de glucose-6P, et le taux d'utilisation de glucose.

2. Le 2DG-(^{14}C) et le 2DG-6P-(^{14}C) doivent être présents à l'état de traces, c'est-à-dire que leurs concentrations dans le sang et les tissus doivent être quantitativement négligeables et pharmacologiquement inactives.

3. Pour faciliter l'analyse mathématique du modèle, on considère que tout le 2DG-(^{14}C) et le glucose libre dans chaque élément homogène du tissu sont présents dans un compartiment simple dans lequel leurs concentrations sont celles des pools de précurseur pour la réaction de l'hexokinase et le transport du tissu au plasma. Comme il existe des espaces extra et intracellulaires dans chaque élément tissulaire de ce type, cette hypothèse n'est pas entièrement valable. Il s'agit avec l'analyse mathématique du modèle et la description de la méthode, que le modèle tel qu'il est, permette de minimiser voire même d'éliminer les erreurs possibles provenant de l'invalidité de cette hypothèse.

4. Le métabolisme glucidique du cerveau doit être stable, c'est-à-dire que la concentration de glucose plasmatique, le taux d'utilisation locale du glucose par le cerveau et les concentrations des intermédiaires glycolytiques doivent rester constants durant toute la période de mesure.

1.1.3. Analyse mathématique du modèle

L'équation opérationnelle de la méthode pose que si le 2DG-(^{14}C) est introduit dans le sang au temps 0 et circule pendant un temps T, le taux Ri de consommation de glucose dans tout tissu cérébral i peut être calculé, pourvu que la concentration totale de ^{14}C dans le tissu Ci*(T) soit mesurée au temps T.

$$R_i = \frac{\underbrace{C_i^*(T)}_{\substack{^{14}C \text{ total dans le} \\ \text{tissu au temps T}}} - \underbrace{k_1^* e^{-(k_2^* + k_3^*)T} \int_0^T C_p^* e^{(k_2^* + k_3^*)t}\, dt}_{\substack{^{14}C \text{ restant dans le précurseur présent} \\ \text{dans le tissu au temps T}}}}{\underbrace{\left[\frac{\lambda \cdot V_m^* \cdot K_m}{\phi \cdot V_m \cdot K_m^*}\right]}_{\substack{\text{Facteur de} \\ \text{correction} \\ \text{pour effet} \\ \text{isotopique}}} \left[\underbrace{\int_0^T \left(\frac{C_p^*}{C_p}\right) dt}_{\substack{\text{Activité} \\ \text{spécifique} \\ \text{plasmatique} \\ \text{intégrée}}} - \underbrace{e^{-(k_2^* + k_3^*)T} \int_0^T \left(\frac{C_p^*}{C_p}\right) e^{(k_2^* + k_3^*)t}\, dt}_{\substack{\text{Correction pour le délai d'équilibration} \\ \text{entre tissu et plasma}}}\right]}$$

$$= \frac{\text{Quantité totale de produit marqué formé pendant l'intervalle de temps de 0 à T}}{\left[\begin{array}{l}\text{Facteur de} \\ \text{correction} \\ \text{pour effet} \\ \text{isotopique}\end{array}\right] \left[\text{Activité spécifique intégrée du précurseur dans le tissu}\right]}$$

Le numérateur de l'équation représente la quantité de produit radioactif formé dans un intervalle de temps de 0 à T. Elle est égale à Ci*(T) (concentrations combinées de 2DG-(^{14}C) et de 2DG-6P-(^{14}C) dans le tissu au temps T, mesurées par autoradiographie quantitative) moins la concentration de 2DG-(^{14}C) libre non métabolisé encore présent dans le tissu. Cette dernière est calculée à partir de l'évolution de la concentration de 2DG-(^{14}C) dans le plasma artériel et des constantes cinétiques appropriées.

Le dénominateur représente l'activité spécifique intégrée du pool de précurseur multipliée par le facteur de correction pour effet isotopique appelé aussi "lumped constant". Le terme avec le facteur exponentiel au dénominateur tient compte du délai d'équilibration entre le pool de précurseur dans le tissu et le plasma dans lequel l'activité spécifique est mesurée directement. L'activité spécifique du pool de précurseur dans le plasma est calculée en fonction des concentrations de glucose et de 2DG-(^{14}C) mesurées dans le plasma au cours de l'expérimentation.

1.1.3.1. Constantes cinétiques

- k_1* et k_2* sont les constantes cinétiques pour le transport du 2DG-(^{14}C) entre le sang et le tissu. Elles sont influencées essentiellement par les propriétés du système de transport et par les concentrations de glucose plasmatique et tissulaire.
- k_3* est la constante cinétique chez le rat adulte normal conscient pour la matière blanche et pour la matière grise.

1.1.3.2. Facteur de correction pour effet isotopique ou "lumped constant"

La lumped constant corrige les différences dans le comportement cinétique du 2DG-(^{14}C) et du glucose avec l'hexokinase. Elle est la combinaison de 6 constantes et le produit de 4 facteurs $1/\phi$, λ , Vm*/Vm et Km/Km*.

- Le premier facteur est l'inverse de ϕ, une constante entre 0 et 1 qui reflète l'activité de la glucose-6-phosphatase. Cette enzyme est présente dans le cerveau de mammifère mais son activité est négligeable (McIlwain, 1985). Ce facteur est donc égal ou proche de 1 dans l'ensemble du cerveau.

- Le deuxième facteur λ représente le rapport des volumes de distribution du 2DG-(^{14}C) et du glucose dans le tissu cérébral. Bien que le volume de distribution pour le 2DG-(^{14}C) varie dans les différents tissus cérébraux, le volume de distribution du glucose varie probablement proportionnellement laissant supposer que ce rapport soit constant dans l'ensemble du cerveau.

- Vm*/Vm est le rapport des vitesses maximales de phosphorylation du 2DG-(^{14}C) et du glucose par l'hexokinase. Ces deux vitesses maximales varient proportionnellement l'une par rapport à l'autre d'un tissu cérébral à l'autre. Le rapport Vm*/Vm reste donc constant dans tout le cerveau.

- Il en est de même pour le rapport des constantes de Michaelis-Menten Km/Km*, qui représente les propriétés cinétiques de l'enzyme.

La "lumped constant" varie nettement d'une espèce à l'autre mais pas de manière significative dans une même espèce et dans des conditions différentes sauf en cas d'hypoglycémie sévère ou d'hyperglycémie. La "lumped constant" est calculée dans le cerveau entier et peut vraisemblablement être considérée comme représentative des "lumped constants" des différents territoires cérébraux. Sa valeur chez le rat albinos est de 0,481.

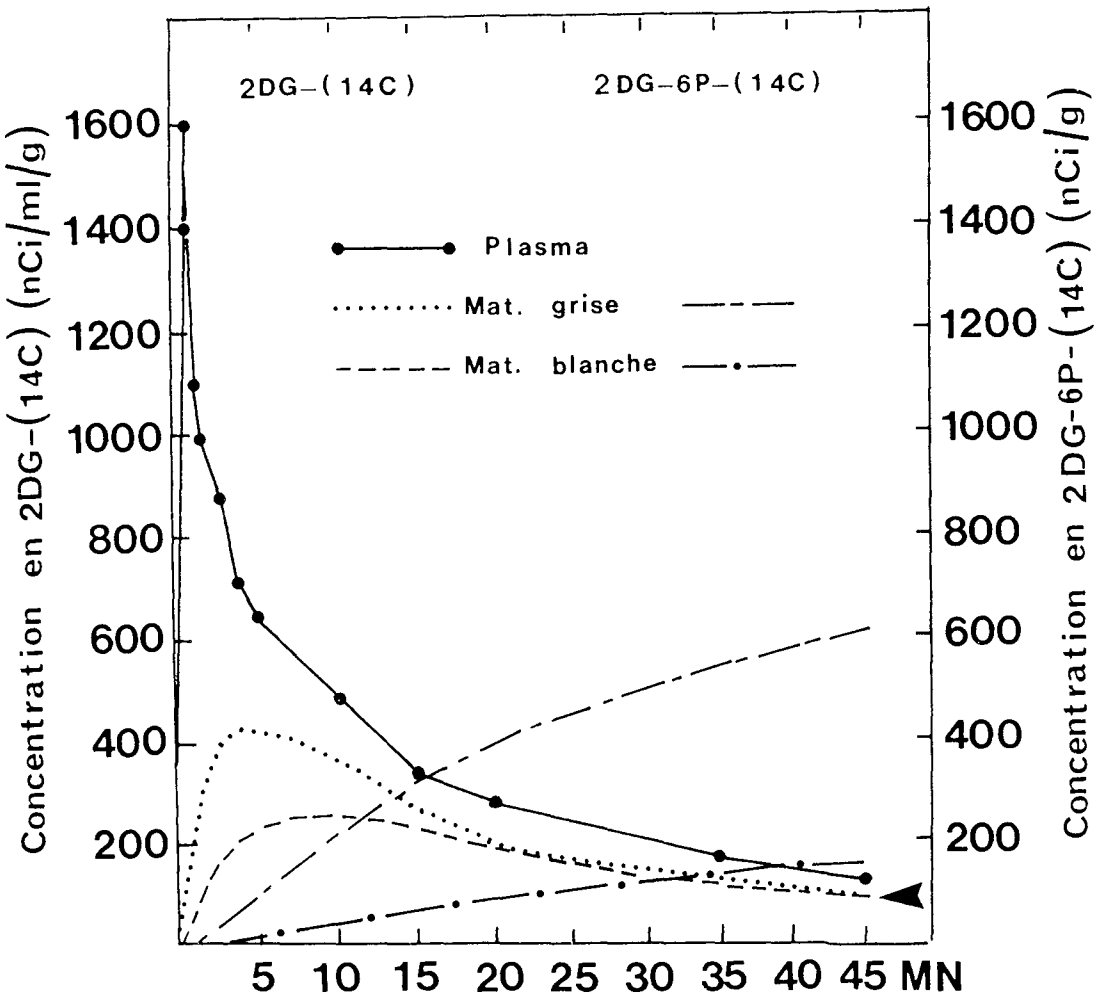


Figure 4 : Représentation graphique de l'évolution des concentrations de 2DG-^{14}C dans le plasma, la matière blanche et la matière grise ainsi que l'évolution des concentrations de 2DG-6P-^{14}C dans la matière blanche et la matière grise chez le rat adulte (Sokoloff et Coll., 1977b).

1.2. Considérations théoriques et pratiques - Limitations de la méthode

1.2.1. Mise en place de la méthode

Pour mesurer Ri, le taux d'utilisation cérébrale locale de glucose, il faut déterminer pour chaque expérience les variables suivantes :

- l'évolution de la concentration artérielle plasmatique de 2DG-(^{14}C), Cp*, du temps zéro jusqu'au moment du sacrifice de l'animal, T.
- la concentration artérielle plasmatique de glucose, Cp, au cours de la même période.
- la concentration locale de ^{14}C dans le tissu au moment du sacrifice de l'animal Ci* (T).

Pour déterminer la consommation tissulaire de glucose, il est nécessaire de connaître la concentration tissulaire de 2DG-6P-(^{14}C) par rapport à la concentration tissulaire totale de ^{14}C. Pour cela, il faut connaître les valeurs des constantes cinétiques. Comme il n'est pas possible de les mesurer sur chaque animal, il a été choisi d'une part d'administrer le 2DG-(^{14}C) en bolus intraveineux unique au temps 0 et d'autre part, de prolonger l'expérimentation pendant un temps assez long (45 mn) afin que (1) la clairance du 2DG-(^{14}C) plasmatique soit importante et (2) les termes contenant les constantes cinétiques soient devenus trop faibles pour influencer de manière notable le résultat final. Après 45 mn, les teneurs tissulaires et plasmatiques de 2DG-(^{14}C) sont très faibles et la concentration cérébrale de 2DG-6P-(^{14}C) représente la plus grande partie du ^{14}C dans les tissus.

L'évolution des concentrations de 2DG-(^{14}C) dans le plasma artériel, la matière blanche et la matière grise après injection intraveineuse du traceur ainsi que celle des concentrations de 2DG-6P-(^{14}C) dans la matière blanche et la matière grise du cerveau de rat adulte sont illustrées sur la figure 4. Lorsque la concentration plasmatique de 2DG-(^{14}C) baisse depuis son pic après l'injection, les

concentrations tissulaires de 2DG-(^{14}C) augmentent jusqu'à ce que tissu et plasma atteignent un équilibre. Lorsque la concentration plasmatique de 2DG-(^{14}C) continue à baisser en dessous de ce niveau d'équilibre, il y a une perte de 2DG-(^{14}C) des tissus vers le plasma ainsi qu'une conversion continue du 2DG-(^{14}C) en 2DG-6P-(^{14}C) conduisant à une diminution des concentrations du 2DG-(^{14}C) libre dans le tissu. Après 45 mn, les concentrations tissulaires et plasmatiques en 2DG-(^{14}C) ont atteint des niveaux très bas et les concentrations tissulaires en 2DG-6P-(^{14}C) dans les tissus représentent la plus grande partie du ^{14}C mesuré, en particulier dans la matière grise.

1.2.2. Limitations de la méthode

L'équation opérationnelle de la méthode définit les variables à mesurer pour déterminer l'utilisation cérébrale locale de glucose. Cette équation est généralement applicable mais elle contient plusieurs constantes (les constantes cinétiques k_1, k_2, k_3 et la "lumped constant") qui ne sont pas déterminées pour chaque animal au moment de l'expérience mais dans des groupes séparés d'animaux de la même espèce et dans des conditions expérimentales souvent différentes. Il n'est pas certain que ces constantes soient universelles et s'appliquent à tous les animaux d'une espèce pris individuellement dans toutes les conditions, en particulier dans des conditions pathologiques.

De même, l'équation est basée sur le fait que le 2DG-6P-(^{14}C) une fois formé est piégé dans le tissu cérébral pendant toute la durée de l'expérience. Or, le 2DG-6P-(^{14}C) peut quitter le cerveau après hydrolyse en 2DG-(^{14}C) libre par la glucose-6-phosphatase. Bien que l'activité de cette enzyme soit très faible dans le cerveau, elle n'est pas absente et ce phénomène de perte de ^{14}C n'est pas toujours négligeable.

Tous ces facteurs sont des sources potentielles d'erreurs et des considérations spéciales sont nécessaires pour définir leurs effets et les limitations qu'ils imposent.

1.2.2.1. Les constantes cinétiques

Les constantes cinétiques établies pour un groupe de rats normaux conscients ne sont pas utilisables dans toutes les conditions qu'elles soient physiologiques, pharmacologiques ou pathologiques. Mais la méthode a été mise au point pour minimiser les erreurs dues à ces constantes. En effet, l'influence des constantes cinétiques est prédominante très tôt après l'injection de 2DG-(^{14}C) mais diminue avec le temps pour devenir relativement insignifiante à 45 mn.

Les termes contenant ces constantes atteignent à 45 mn, 5 à 10 % de la valeur des termes dont ils sont soustraits. Dans ces conditions, des erreurs faites sur les constantes cinétiques n'induiront qu'une erreur négligeable sur les résultats finaux.

Les constantes cinétiques peuvent être fortement diminuées dans des conditions extrêmes comme une réduction importante du débit sanguin cérébral ou une hypo ou hyperglycémie sévère (Gjedde, 1982 ; Orzi et Coll., 1988 ; Pardridge, 1983). Dans ce cas, les constantes doivent être redéterminées.

1.2.2.2. La "lumped constant"

La "lumped constant" est composée de 6 constantes :

- ϕ influencée par l'hydrolyse du glucose-6P en glucose et en phosphate par la glucose-6-phosphatase.
- λ , le rapport des espaces de distribution tissulaire pour le 2DG et le glucose.
- Vm*/Vm et Km/Km*.

Bien que chaque constituant individuel puisse varier d'une structure à l'autre, on considère que la "lumped constant" est la même pour l'ensemble du cerveau. La "lumped constant" déterminée chez l'animal normal et conscient, peut-elle être appliquée aux états pathologiques ? En effet, un dommage cellulaire peut perturber la compartimentation cellulaire normale. De même λ , le rapport des espaces

de distribution pour le 2DG-(^{14}C) et le glucose peut être différent dans le tissu endommagé et le tissu normal. De plus, dans les états pathologiques, il pourrait y avoir une libération d'hydrolases acides lysosomiales qui pourraient hydrolyser le glucose-6P et altérer la valeur de Φ.

Sokoloff et Coll. (1977b) ont constaté que dans un tissu cérébral anatomiquement normal, des changememts extrêmes de la concentration en glucose plasmatique peuvent modifier la "lumped constant". Pour une glycémie variant entre 85 et 300 mg/dl, la "lumped constant" est très peu modifiée. Par contre, elle est fortement altérée dans le cas d'hypo ou d'hyperglycémies sévères (Pettigrew et Coll., 1983 ; Schuier et Coll., 1981 ; Suda et Coll., 1981).

1.2.2.3. Rôle de la glucose-6-phosphatase

Une des hypothèses fondamentales du modèle sur lequel l'équation opérationnelle est basée est que le 2DG-6P-(^{14}C) formé reste emprisonné dans le tissu pendant la durée de l'expérimentation. Il est vraisemblable qu'il n'y ait pas de perte de 2DG-6P-(^{14}C) au niveau des tissus car :

- il ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique,
- il n'est pas un bon substrat pour les enzymes dont la concentration est élevée dans le cerveau,
- les activités des enzymes susceptibles de le métaboliser efficacement sont faibles.

Les travaux de Sokoloff et Coll. (1977b) ont confirmé cette hypothèse en montrant que le cerveau perd effectivement du ^{14}C pendant la période de mesure qui peut être considéré comme étant du 2DG-(^{14}C). La perte de 2DG-6P-(^{14}C) de différents tissus cérébraux est assez faible bien qu'elle ne soit pas nulle. On peut alors considérer que le traceur est essentiellement piégé dans le tissu cérébral pour une période expérimentale n'excèdant pas une heure. Cependant, le 2DG-6P-(^{14}C) n'est pas retenu indéfiniment dans le cerveau : il en sort avec une demi-vie de plusieurs heures, sans doute à cause de la glucose-6-phosphatase. Si

l'expérience dure plus d'une heure, la perte de marquage due à la glucose-6-phosphatase ne peut être négligée. Il faut tenir compte de l'activité phosphatasique en introduisant deux autres constantes dans l'équation, k_4,et k_5.

1.3. Conclusion

La méthode au 2-désoxyglucose-(^{14}C) permet de déterminer quantitativement les taux d'utilisation de glucose simultanément dans tous les composants structuraux et fonctionnels du système nerveux central. En raison de la relation entre l'activité fonctionnelle locale et le métabolisme énergétique, cette méthode permet d'identifier toutes les structures dont l'activité fonctionnelle est augmentée ou diminuée dans des conditions physiologiques, pharmacologiques ou pathologiques variées (Sokoloff, 1981, 1986).

Les images obtenues ressemblent à des coupes histologiques de tissu nerveux mais sont en réalité le résultat d'un processus biochimique dynamique qui est l'utilisation locale de glucose. Le fait qu'elles représentent les structures anatomiques indique que les taux d'utilisation du glucose sont distribués en fonction de la structure et que les fonctions spécifiques du système nerveux central sont associées aux structures anatomiques spécifiques. Cette méthode représente un nouveau moyen d'étude de la fonction cérébrale simultanément dans toutes les parties du cerveau et permet de contribuer ainsi à la meilleure compréhension du fonctionnement cérébral chez l'homme sain ou malade.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Animaux

Les expériences ont été réalisées sur un total de 60 rats (30 témoins et 30 rats traités au PhB) aux stades de 10, 14, 17, 21, 35 jours et au stade adulte (70 à 80 jours), environ 3 h après l'injection du médicament. Jusqu'au sevrage, les animaux des deux sexes ont été

utilisés. Par contre, à 35 jours et au stade adulte les expériences ont porté uniquement sur des rats mâles, pour éviter les variations de métabolisme énergétique cérébral dues à la cyclicité chez les femelles (Nehlig et Coll., 1985).

La veille du jour de l'expérience, une veine et une artère fémorales sont cathétérisées sous anesthésie légère à l'halothane. Les deux cathéters sont passés sous la peau et ressortis dans le dos au niveau du cou. Une boucle est formée à l'extrémité des deux cathéters qui sont ensuite repoussés sous la peau qui est recousue. Les animaux sont remis dans leur environnement normal, avec la mère pour les rats en allaitement. Les expériences sont réalisées le jour suivant uniquement sur les animaux n'ayant pas souffert de l'opération et n'ayant pas perdu de poids.

2.2. Mesure de l'utilisation cérébrale locale de glucose

Le jour de l'expérience, les rats sont transférés dans une boîte en plastique de taille variable selon le stade étudié. Ce dispositif permet l'accès aux cathéters et le libre déplacement de l'animal. Les fils au niveau de la peau du cou sont sectionnés pour permettre de ressortir les cathéters.

L'utilisation cérébrale locale de glucose (UCLG) est mesurée à l'aide de la méthode autoradiographique quantitative au 2-désoxyglucose-(^{14}C) décrite par Sokoloff et Coll. (1977b). Le 2DG-(^{14}C) (125 µCi/kg ; activité spécifique 50 à 55 mCi/mmole) est injecté par voie intraveineuse sous forme d'un bolus. Neuf à 20 échantillons de sang artériel sont prélevés à des temps prédéterminés pendant les 45 mn suivant l'administration du 2DG dans des tubes capillaires pour les animaux en développement ou dans des tubes à glycémie pour les rats adultes. Les volumes des échantillons varient de 10 à 75 µl en fonction de l'âge de l'animal. Les échantillons de sang sont immédiatement centrifugés et la concentration plasmatique de 2DG est déterminée par comptage en scintillation liquide sur des échantillons de 3 à 20 µl. Les concentrations plasmatiques de glucose

sont mesurées sur 3 échantillons pour les petits animaux et sur tous les échantillons pour les adultes. Environ 45 mn après l'administration du 2DG, les animaux sont sacrifiés par décapitation. Les cerveaux sont rapidement prélevés, congelés dans du méthylbutane refroidi à -40°C, enrobés dans du milieu d'inclusion et stockés à -80°. Les cerveaux sont ensuite sectionnés en coupes transversales de 20 µm d'épaisseur dans un cryostat à -22°C. Les sections sont prélevées sur des lamelles de verre et déshydratées sur une platine chauffante à 60°C. Les coupes cérébrales sont ensuite soumises à une autoradiographie sur film Kodak SB5 en même temps que des standards de méthylméthacrylate-(^{14}C) calibrés par rapport à des coupes cérébrales dont la teneur en ^{14}C est connue, selon la méthode décrite par Sokoloff et Coll. (1977b). Une série spéciale de standards calibrés à faible concentration en ^{14}C est utilisée pour les rats âgés de 10, 14 et 17 jours. Des sections adjacentes sont prélevées et colorées à l'aide de thionine pour l'indentification histologique de structures spécifiques.

Les autoradiogrammes sont analysés en densitométrie quantitative à l'aide d'un système d'analyses d'images ou d'un microdensitomètre manuel. Les mesures de densité optique de chaque structure, définie anatomiquement selon l'atlas de Sherwood et Timiras (1970) pour le rat en développement et de Paxinos et Watson (1982) pour le rat adulte, ont été réalisées bilatéralement dans un minimum de quatre sections adjacentes. Les concentrations tissulaires de ^{14}C sont déterminées à partir des densités optiques des autoradiogrammes des standards calibrés.

2.3. Calcul de l'utilisation cérébrale locale de glucose

Pour les calculs finaux, les temps de prélèvement sont corrigés afin de tenir compte du délai lié au volume de sang résiduel dans le cathéter. Ce délai est calculé à partir du volume du cathéter artériel et de la valeur du débit sanguin et varie entre 2 et 6 s.

L'utilisation cérébrale locale de glucose est calculée à partir de la concentration tissulaire de ^{14}C, des concentrations plasmatiques de 2DG-(^{14}C) et de glucose et des constantes appropriées selon l'équation opérationnelle de la méthode (Sokoloff et Coll., 1977b).

2.4. Variables physiologiques

Juste avant l'administration du 2DG, la pression artérielle des animaux est mesurée à l'aide d'un manomètre à mercure. Les animaux en allaitement sont maintenus sous une lampe chauffante afin de maintenir leur température corporelle à des valeurs normales. L'hématocrite est déterminé 30 mn après l'injection du traceur radioactif. Les valeurs de pH, pO2 et pCO_2 artériels sont mesurées juste avant le sacrifice des animaux sur des échantillons de sang de 40 à 80 µl à l'aide d'un analyseur des gaz du sang.

2.5. Analyses statistiques

Les valeurs d'utilisation cérébrale locale de glucose (UCLG) ont été déterminées dans 58 structures, dans 12 groupes de 5 animaux, 6 groupes de témoins et 6 groupes de rats traités au PhB. Trois analyses statistiques ont été appliquées. Tout d'abord, une analyse de variance à deux facteurs a permis de tester l'effet de l'âge, de la nature du traitement et de l'interaction âge-traitement (Kirk, 1968). Dans la seconde analyse, les valeurs d'UCLG à chaque stade du développement ont été comparées à celle du stade précédent dans le groupe des témoins et dans le groupe des animaux traités au PhB à l'aide d'un test t de Bonferroni pour comparaisons multiples (Kirk, 1968). Cette procédure de comparaisons multiples a été choisie pour réduire l'éventualité d'erreurs de type II en raison du nombre élevé d'analyses réalisées. Enfin, à chaque stade du développement, les valeurs d'UCLG obtenues chez les animaux traités au PhB ont été comparées à celles du groupe témoin à l'aide d'un test t de Student.

TABLEAU I : EFFETS DU PHENOBARBITAL SUR LES VARIABLES PHYSIOLOGIQUES DU RAT EN DEVELOPPEMENT.
Les valeurs représentent des moyennes ± E.S.M du nombre d'animaux entre parenthèses, sauf pour les poids de cerveaux et les concentrations plasmatiques de PhB qui représentent des moyennes ± E.S.M de 5 à 22 animaux.

		10 jours (n=5)	14 jours (n=5)	17 jours (n=5)	21 jours (n=5)	35 jours (n=5)	Adultes (n=5)
Poids corporel (g)	T	24 ± 1	33 ± 2	42 ± 2	49 ± 1	141 ± 5**	422 ± 6**
	PhB	21 ± 1[b]	30 ± 1[a]	38 ± 1[a]	46 ± 1[a]	112 ± 8**[b]	399 ± 8**[a]
Poids du cerveau (g)	T	0.96±0.01	1.22±0.01**	1.31±0.02*	1.44±0.02*	1.71±0.01**	2.11±0.02**
	PhB	0.86±0.01[b]	1.14±0.01**[b]	1.21±0.02*[b]	1.33±0.02*[b]	1.60±0.02**[b]	2.01±0.03**[b]
Concentrations plasmatiques de glucose (mg/100 ml)	C	127 ± 2	141 ± 6	148 ± 3	131 ± 3	155 ± 8*	155 ± 8
	PhB	96 ± 5[d]	128 ± 5**[a]	147 ± 6*	129 ± 3	140 ± 5	166 ± 5*
Concentrations plasmatiques de PhB (µg/ml)	PhB	70 ± 3	80 ± 3*	71 ± 8*	53 ± 2**	41 ± 2**	---
Pression artérielle (mmHg)	T	50 ± 3	54 ± 2	67 ± 2**	79 ± 2**	102 ± 2**	124 ± 2**
	PhB	51 ± 2	54 ± 1	70 ± 3**	80 ± 2**	106 ± 2**	129 ± 2**
Hématocrite (%)	T	31 ± 1	29 ± 1	24 ± 1**	34 ± 1**	40 ± 1**	46 ± 1**
	PhB	29 ± 2	23 ± 1[b]	24 ± 1	26 ± 1[d]	35 ± 2**[a]	43 ± 1**[a]
pH artériel	T	7.48±0.02	7.43±0.02	7.48±0.02	7.51±0.01	7.49±0.01	7.43±0.03
	PhB	7.44±0.01	7.47±0.02	7.47±0.02	7.51±0.01	7.48±0.01	7.46±0.02
pO_2 artérielle (mmHg)	T	86 ± 2	86 ± 2	91 ± 1	87 ± 1	86 ± 3	81 ± 2
	PhB	82 ± 3	82 ± 2	82 ± 2[c]	86 ± 2	76 ± 5	82 ± 3
pCO_2 artérielle (mmHg)	T	28 ± 2	35 ± 2*	33 ± 2	30 ± 2	35 ± 1	34 ± 1
	PhB	36 ± 2[a]	38 ± 1	33 ± 4	30 ± 1	37 ± 1*	36 ± 2

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, différences statistiquement significatives entre un stade du développement donné et le stade précédent (test t de Bonferroni).
a $p < 0.05$, b $p < 0.01$, c $p < 0.005$, d $p < 0.0005$, différences statistiquement significatives par rapport aux [illegible] (test t de Student)

3. EFFETS A COURT ET A LONG TERME DU PHENOBARBITAL SUR L'UTILISATION CEREBRALE LOCALE DE GLUCOSE

3.1. Variables physiologiques (tableau 1)

Le poids corporel et cérébral des animaux augmente significativement entre 21 et 35 jours et entre 35 jours et le stade adulte chez les témoins et chez les rats traités au PhB ($p < 0,01$, test t de Bonferroni). Cependant, le poids corporel et cérébral des animaux traités au PhB est significativement réduit de 5 à 21 % par rapport aux témoins à tous les stades du développement postnatal étudiés ainsi que chez l'adulte (test t de Student).

La glycémie est significativement diminuée de 24 et 9 % respectivement à 10 et 14 jours après la naissance chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins (test t de Student).

La pression artérielle augmente significativement à partir du 14e jour et est identique dans les deux groupes d'animaux.

L'hématocrite augmente significativement à partir du 17e jour chez les témoins et du 35e jour chez les animaux traités au PhB. De plus, les valeurs de l'hématocrite sont significativement diminuées sauf à 10 et 17 jours chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins (test t de Student).

Les valeurs de pH et de pO_2 artériels sont identiques dans les deux groupes d'animaux quel que soit l'âge sauf pour la pO_2 à 17 jours qui est significativement diminuée de 10 % chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins. La pCO_2 artérielle augmente significativement entre 10 et 14 jours chez les témoins et entre 21 et 35 jours chez les animaux traités au PhB (test t de Bonferroni). La pCO_2 n'est pas affectée par le PhB sauf à 10 jours où la valeur est significativement augmentée chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins (test t de Student).

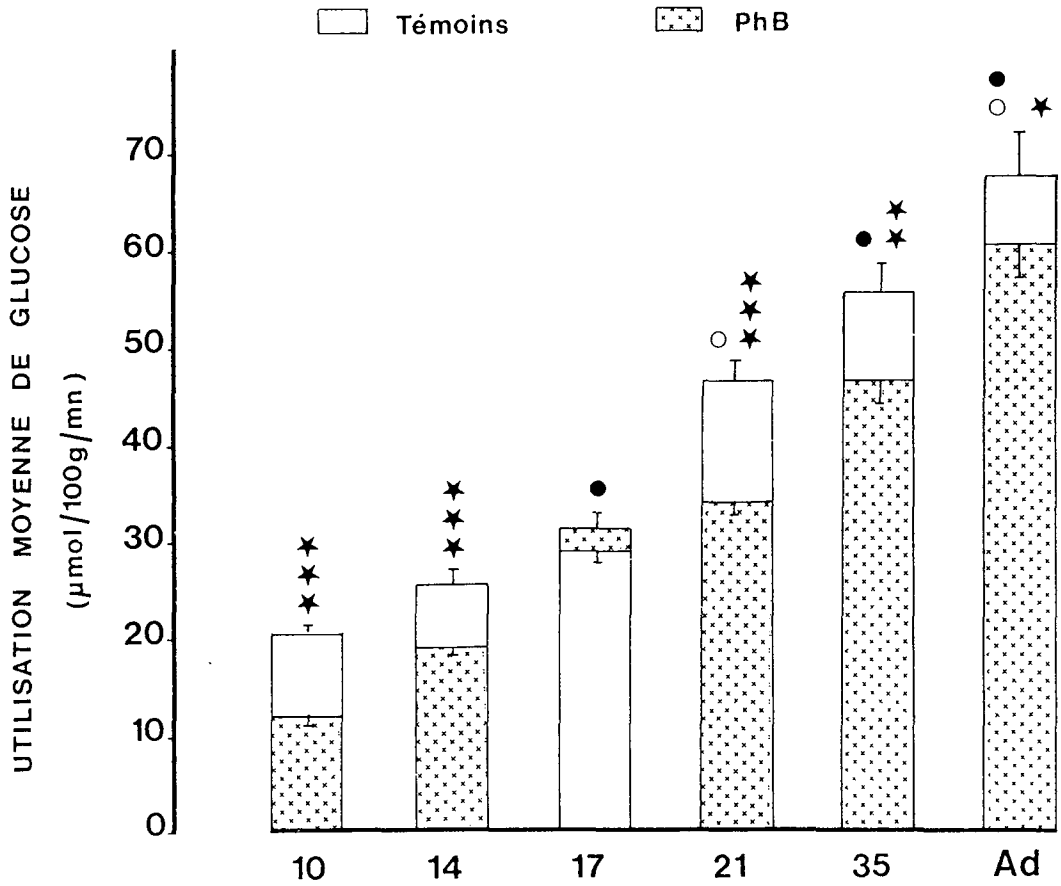


Figure 5 : Effets d'un traitement chronique précoce au PhB sur l'évolution postnatale de l'utilisation cérébrale moyenne de glucose.
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins à un stade donné du développement (test t de Student) ;
o $p < 0,05$, différence statistiquement significative entre un stade du développement et le stade précédent chez les témoins;
● $p < 0,05$, différence statistiquement significative entre un stade du développement et le stade précédent chez les animaux traités au PhB (test t de Bonferroni). Abréviation : Ad, adulte.

3.2. Effets du phénobarbital sur l'utilisation cérébrale de glucose

3.2.1. Utilisation cérébrale moyenne de glucose

Les taux d'utilisation cérébrale moyenne de glucose augmentent au cours du développement postnatal dans les deux groupes d'animaux. Chez les témoins, l'utilisation cérébrale moyenne de glucose est relativement faible aux trois premiers stades étudiés et varie de 21 à 30 µmol/100g/mn. Entre 17 et 21 jours, l'utilisation de glucose s'accroît significativement de 38 % ($p < 0,05$, test t de Bonferroni). Entre 21 et 35 jours et 35 jours et le stade adulte, les valeurs augmentent de 15 et 19 % respectivement (figure 5).

Un traitement précoce au PhB affecte l'évolution postnatale des taux d'utilisation cérébrale de glucose. En effet, l'utilisation moyenne de glucose augmente significativement entre 14 et 17 jours, 21 et 35 jours ainsi qu'entre 35 jours et le stade adulte (test t de Bonferroni) (figure 5). De plus, le PhB induit une dépression générale des taux d'utilisation de glucose à tous les stades étudiés sauf à 17 jours. La diminution des taux d'utilisation de glucose apparaît dans toutes les structures cérébrales étudiées et se traduit par une réduction significative des valeurs moyennes d'utilisation de glucose de 41 % à 10 jours et de 16 à 27 % à 14, 21 et 35 jours (test t de Student). La dépression des taux d'utilisation de glucose induite par le PhB persiste à l'âge adulte. En effet, au stade adulte, l'utilisation moyenne de glucose est significativement diminuée de 11 % chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins et est le reflet d'une baisse de l'utilisation de glucose dans 36 des 58 structures cérébrales étudiées.

3.2.2. Effets de l'âge et du traitement sur l'utilisation cérébrale locale de glucose : analyse de variance à deux facteurs

Les résultats de l'analyse de variance à deux facteurs montrent un effet de l'âge et du traitement sur les taux d'utilisation cérébrale de glucose (Mémoire D). L'utilisation cérébrale locale de glucose (UCLG) varie de manière significative en fonction de l'âge dans toutes les structures étudiées ($p < 10^{-4}$). Le traitement au PhB affecte également les valeurs d'UCLG dans toutes les aires cérébrales sauf dans le septum latéral et le noyau interpédonculaire. Les valeurs de p sont inférieures à 10^{-4} sauf dans 8 structures où p varie de 0,05 à 3.10^{-4}. Dans 35 des 58 structures étudiées, il existe une interaction significative entre l'âge et le traitement. Parmi ces structures : 4 aires auditives, le cortex auditif, le noyau genouillé médian, la collicule inférieure et le lemnisque latéral ; deux structures visuelles, le cortex visuel et la collicule supérieure ainsi que le noyau vestibulaire. Parmi les structures limbiques, il existe une interaction entre l'âge et le traitement dans le cortex frontopariétal, aire somatosensorielle, dans les deux régions du septum, le gyrus denté, le thalamus médiodorsal et l'habenula latérale ainsi que toutes les régions limbiques du cerveau moyen et du cerveau postérieur. Dans l'hypothalamus, l'interaction entre l'âge et le traitement est significative dans toutes les structures sauf dans le noyau paraventriculaire. De même, dans les aires motrices, il existe une interaction âge-traitement dans les deux parties de la substance noire, le noyau subthalamique et le thalamus ventroantérieur ainsi que dans toutes les aires des circuits cérébelleux du système moteur sauf le cortex cérébelleux.

3.2.3. Effets du phénobarbital sur la maturation du métabolisme énergétique cérébral

Une exposition chronique précoce au PhB induit une dépression à court terme des taux d'UCLG, c'est-à-dire pendant la période de traitement entre le 10e et le 35e jour postnatal. De même, nous avons montré qu'un tel traitement induit une diminution de l'incorporation du

carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux et une augmentation simultanée de l'utilisation du ßHB en tant que précurseur de la biosynthèse de ces acides aminés entre le 7e et le 35e jour après la naissance (Mémoires A, B et C ; chap. 1). De plus, le PhB induit à long terme une diminution des taux d'UCLG chez le rat adulte. La dépression de l'utilisation cérébrale de glucose observée chez les animaux traités au PhB s'accompagne d'une réduction du poids corporel et cérébral de ces animaux par rapport aux témoins pendant toute la période étudiée (tableau 1).

La réduction des taux d'UCLG induite par le PhB est particulièrement importante aux premiers stades du développement étudiés, c'est-à-dire à 10 et 14 jours après la naissance. La diminution importante des taux d'utilisation de glucose entre 10 et 14 jours observée chez les animaux traités au PhB apparaît à une période critique de la maturation du métabolisme énergétique cérébral. En effet, la caractéristique fondamentale du métabolisme énergétique du cerveau mature in vivo est la forte et rapide incorporation du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux : cette voie métabolique se développe chez le rat entre le 10e et le 15e jour postnatal pour atteindre vers 22 jours les taux observés chez l'adulte (Cocks et Coll., 1970 ; DeVivo et Coll., 1975 ; Gaitonde et Richter, 1966). L'apparition de l'incorporation rapide du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux est bien corrélée à l'augmentation de la consommation cérébrale d'O_2 (Fazekas et Coll., 1951) et de l'activité des enzymes cérébrales impliquées dans le métabolisme oxydatif (Sokoloff, 1973).

Un traitement précoce au PhB modifie le profil de maturation cérébrale et induit une augmentation significative de l'UCLG entre 14 et 17 jours puis à nouveau entre 21 et 35 jours dans l'ensemble des structures cérébrales étudiées. Au contraire, chez les témoins, l'utilisation cérébrale de glucose s'accroît significativement entre 17 et 21 jours dans presque toutes les aires cérébrales (Nehlig et Coll., 1988a, 1988b, figure 5). L'augmentation de l'utilisation de glucose à 17 jours chez les animaux traités au PhB est le reflet à la fois de la dépression importante de l'utilisation de glucose à 10 et 14 jours chez

les animaux traités au PhB par rapport aux témoins et de l'absence de différence à 17 jours entre les deux groupes d'animaux. Le stade de 17 jours apparaît très différent des autres stades du développement : en effet, le PhB induit une dépression généralisée des taux d'UCLG au cours du développement postnatal sauf à 17 jours. Il semble difficile de donner une explication satisfaisante à ce résultat. Toutefois, l'étude de l'évolution postnatale du couplage entre le débit sanguin et le métabolisme cérébral chez le rat en développement a permis de mettre en évidence un découplage transitoire entre ces deux paramètres de l'activité fonctionnelle cérébrale uniquement à 17 jours alors qu'ils restent couplés à tous les autres stades étudiés (Nehlig et Coll., 1988a, 1988b, 1989a, 1989b). Le stade de 17 jours représente certainement chez le rat une période critique du développement cérébral : à ce stade, le taux d'incorporation du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux devient élevé (Cocks et Coll., 1970 ; Gaitonde et Richter, 1966) et l'utilisation des composés cétoniques par le cerveau est encore très active (DeVivo et Coll., 1975 ; Hawkins et Coll., 1971). L'activité importante de ces deux voies métaboliques est bien corrélée à la maturation rapide du cerveau pendant cette période caractérisée principalement par une myélinisation intense (Patsalos et Wiggins, 1982 ; Wiggins, 1986). A 17 jours, la pO_2 est significativement diminuée de 10 % chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins (tableau 1). On a montré que l'utilisation cérébrale de glucose augmente au cours d'une hypoxie modérée, c'est-à-dire pour des valeurs de pO_2 variant de 40 à 50 mmHg (Cohen et Coll., 1967 ; MacNeil et Bryan, 1988 ; Siesjö, 1978). Cependant, la faible diminution de la pO_2 observée chez les animaux traités au PhB n'est vraisemblablement pas à l'origine des valeurs élevées d'UCLG à 17 jours par rapport aux autres stades étudiés.

Chez le rat adulte, 45 jours après l'arrêt du traitement pharmacologique, les taux d'UCLG restent significativement réduits dans 36 parmi les 58 structures cérébrales étudiées chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins. Les effets à long terme du PhB sur le métabolisme énergétique cérébral s'accompagnent d'une réduction du poids corporel et cérébral des animaux (tableau 1). De plus, chez la souris des déficits cellulaires cérébraux importants ont été mis en évidence

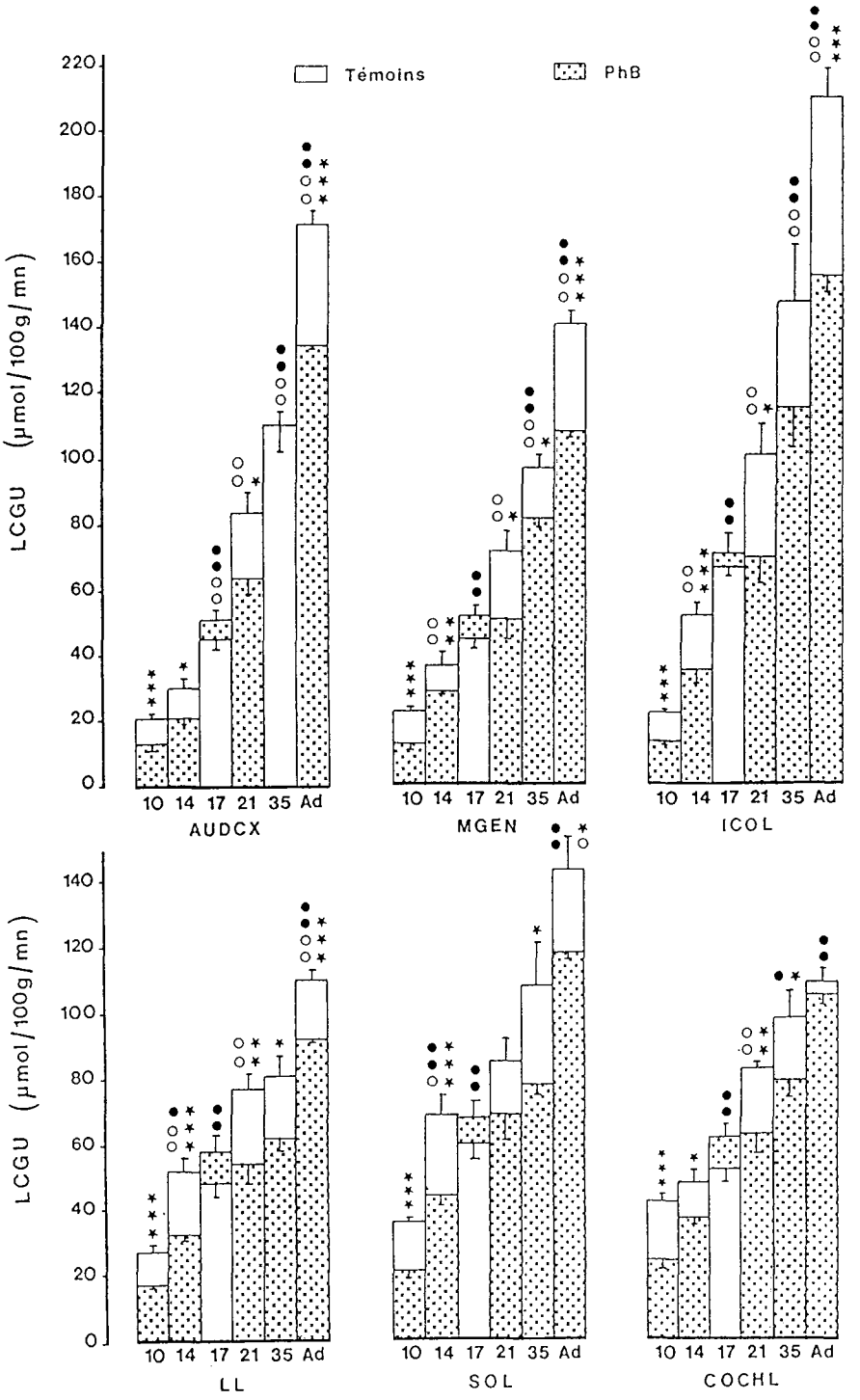


Figure 6 : Effets d'un traitement chronique précoce au PhB sur l'évolution post-natale de l'utilisation de glucose dans les structures du système auditif.
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins à un stade donné du développement (test t de Student) ;
○ $p < 0,05$, ○○ $p < 0,01$, différences statistiquement significatives entre un stade du développement et le stade précédent chez les témoins;
● $p < 0,05$, ●● $p < 0,01$, différences statistiquement significatives entre un stade du développement et le stade précédent chez les animaux traités au PhB (test t de Bonferroni).
Abréviations : Ad :adulte ; AUDCX : cortex auditif ; MGEN : noyau genouillé médian ; ICOL : collicule inférieure ; LL : lemnisque latéral ; SOL : olive supérieure ; COCHL : noyau cochléaire.

après une exposition précoce au PhB, en particulier au niveau du cervelet et de l'hippocampe et à un degré moindre au niveau du cortex cérébral (Yanai, 1984 ; Yanai et Bergman, 1981 ; Yanai et Coll., 1979). Une exposition précoce au PhB induit également des déficits comportementaux à long terme : parmi ceux-ci, des perturbations de l'activité locomotrice ainsi que des capacités d'apprentissage en labyrinthes (Armitage , 1952 ; Diaz et Schain, 1977 ; McBride et Coll., 1985 ; Middaugh et Coll., 1975, 1981a, 1981b ; Murai, 1966 ; Pick et Yanai, 1984, 1985).

3.3. Effets du phénobarbital sur l'utilisation cérébrale de glucose dans les systèmes sensoriels

Le retard de croissance généralisé induit par le PhB, associé à une dépression des taux d'utilisation cérébrale de glucose particulièrement importante aux premiers stades du développement étudiés, soulève le problème de l'acquisition des fonctions telles que l'audition et la vision qui se situent respectivement vers le 12e et le 15e jour après la naissance chez le rat (Crowly et Hepp Reymond, 1966 ; Dowling et Sidman, 1962 ; Myslicevek, 1970 ; Rose et Ellingson, 1970 ; Tilney, 1933). Quels sont les effets du PhB sur la maturation métaboliques des structures impliquées dans le contrôle de ces grandes fonctions ?

3.3.1. Fonction auditive

3.3.1.1. Evolution postnatale chez les témoins

Comme le montre la figure 6, chez les animaux témoins, l'utilisation de glucose augmente significativement entre 10 et 14 jours dans 4 aires auditives : 2 structures postérieures qui sont le lemnisque latéral et l'olive supérieure, le relai mésencéphalique, c'est-à-dire la collicule inférieure et le relai thalamique, le noyau genouillé médian. Entre 14 et 17 jours, l'UCLG s'accroît significativement dans le cortex

auditif et entre 17 et 21 jours dans 5 des 6 structures auditives étudiées. Entre 21 et 35 jours et 35 jours et le stade adulte, les taux d'UCLG augmentent respectivement dans 3 et 5 structures (test t de Bonferroni) (figure 6).

A 10 jours, le rat ne répond à aucun stimulus auditif, la maturation de la fonction auditive se situe entre le 12e et le 15e jour postnatal (Tilney, 1933). Elle est caractérisée par l'ouverture du canal auditif externe vers le 12e jour après la naissance, par un accroissement de la sensibilité aux sons (Crowley et Hepp Reymond, 1966 ; Rose et Ellingson, 1970) et par l'apparition d'une réponse électrique aux stimulations auditives (Mourek et Coll., 1967 ; Mysliveck, 1970). Entre 10 et 14 jours, l'utilisation de glucose s'accroît de manière significative dans 4 structures auditives et la maturation de la fonction auditive est reflétée par l'augmentation significative de l'utilisation de glucose entre 14 et 17 jours dans le cortex auditif qui représente le niveau d'intégration le plus élevé (Nehlig et Coll., 1988a, 1988b ; figure 6).

3.3.1.2. Effets du phénobarbital

Chez les animaux traités au PhB, l'UCLG augmente significativement entre 10 et 14 jours dans deux structures postérieures, le lemnisque latéral et l'olive supérieure. Entre 14 et 17 jours, les taux d'UCLG augmentent dans toutes les structures et ne varient pas significativement entre 17 et 21 jours. Puis entre 21 et 35 jours et 35 jours et le stade adulte, l'utilisation de glucose augmente respectivement dans 4 et dans les 6 structures auditives (test t de Bonferroni) (figure 6).

Un traitement précoce au PhB induit une dépression des taux d'UCLG dans les 6 structures du système auditif étudiées à tous les stades étudiés sauf à 17 jours. La réduction des taux d'UCLG induite par le PhB varie de 38 à 43 % à 10 jours et de 15 à 38 % à 14, 21 et 35 jours par rapport aux témoins sauf dans le cortex auditif à 35 jours où l'utilisation de glucose est identique dans les deux groupes d'animaux

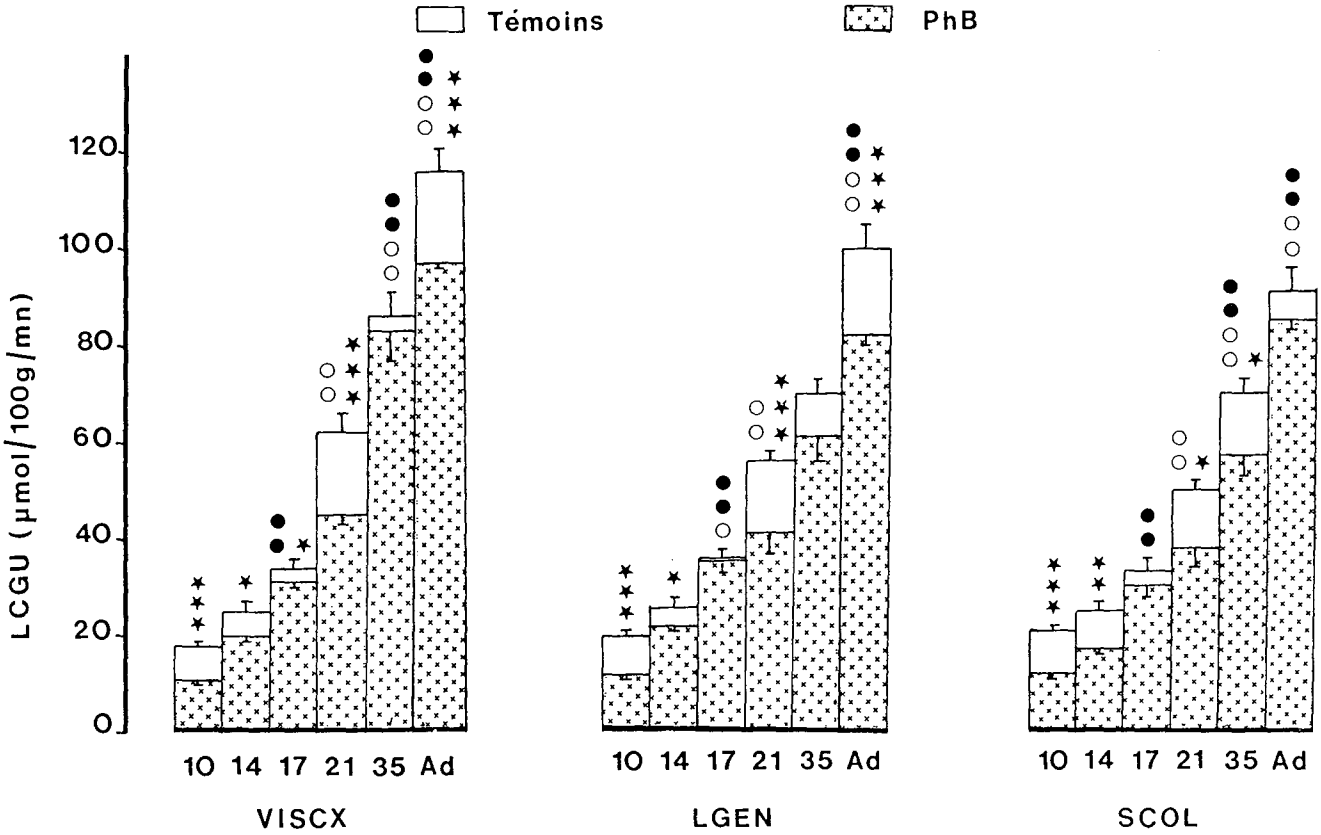


Figure 7 : Effets d'un traitement chronique précoce au PhB sur l'évolution postnatale de l'utilisation de glucose dans les structures du système visuel.
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins à un stade donné du développement (test t de Student);
○ $p < 0,05$, ○○ $p < 0,01$, différences statistiquement significatives entre un stade du développement et le stade précédent chez les témoins ;
●● $p < 0,01$, différence statistiquement significative entre un stade du développement et le stade précédent chez les animaux traités au PhB (test t de Bonferroni).
Abréviations : Ad : adulte ; VISCX : cortex visuel ; LGEN : noyau genouillé latéral ; SCOL : collicule supérieure.

(figure 6). La réduction de l'utilisation cérébrale de glucose persiste chez l'animal adulte dans 5 des 6 aires auditives après une exposition précoce au PhB (test t de Student) (figure 6).

Comme nous l'avons précédemment décrit pour l'utilisation moyenne de glucose, le PhB affecte à court et à long terme les taux d'utilisation de glucose ainsi que le profil de l'évolution postnatale de l'utilisation de glucose dans les aires auditives. En ce qui concerne la maturation de la fonction auditive, chez les animaux traités au PhB l'utilisation de glucose s'accroît significativement uniquement dans les deux structures les plus postérieures du système, alors que chez les témoins celle-ci augmente dans 4 aires auditives. De plus, pendant la période de maturation de la fonction auditive, c'est-à-dire entre le 12e et le 15e jour postnatal, les taux d'UCLG sont réduits de manière importante chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins. Ces résultats montrent que le PhB pourrait induire un retard de maturation au plan métabolique de la fonction auditive.

3.3.2. Fonction visuelle

3.3.2.1. Evolution postnatale chez les témoins

Chez les animaux témoins, l'utilisation de glucose augmente significativement entre 14 et 17 jours dans le noyau genouillé latéral puis entre 17 et 21 jours dans les trois structures du système visuel étudiées : le cortex visuel, le noyau genouillé latéral et la collicule supérieure. Entre 21 et 35 jours, l'utilisation de glucose s'accroît significativement dans la collicule supérieure et entre 35 jours et le stade adulte dans le cortex visuel et le noyau genouillé latéral (test t de Bonferroni) (figure 7).

Chez le rat, l'ouverture des yeux se produit vers le 14-15e jour postnatal (Tilney, 1933) et s'accompagne de changements de l'activité électrique qui présente à 15 jours le profil caractéristique de l'adulte (Dowling et Sidman, 1962 ; Rose et Ellingson, 1970). La maturation de la

fonction visuelle se traduit au plan métabolique par un accroissement significatif de l'utilisation de glucose dans le noyau genouillé latéral entre 14 et 17 jours (Nehlig et Coll., 1988a, 1988b ; figure 7).

3.3.2.2. Effets du phénobarbital

Chez les animaux traités au PhB, l'UCLG augmente significativement entre 14 et 17 jours dans les trois structures du système visuel étudiées. Entre 17 et 21 jours, les valeurs d'utilisation de glucose ne sont pas modifiées puis augmentent à nouveau entre 21 et 35 jours dans le cortex visuel et la collicule supérieure et dans les trois structures entre 35 jours et le stade adulte (test t de Bonferroni) (figure 7).

Un traitement précoce au PhB induit une diminution des taux d'UCLG dans les trois structures du système visuel sauf à 17 jours. Les valeurs d'utilisation de glucose sont significativement réduites de 39 à 43 % à 10 jours et de 15 à 32 % à 14 et 21 jours chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins. A 35 jours, l'utilisation de glucose est diminuée uniquement dans la collicule supérieure après un traitement au PhB. Chez l'adulte, la dépression de l'utilisation de glucose induite par le PhB persiste au niveau du cortex visuel et du noyau genouillé latéral (test t de Student) (figure 7).

En conclusion, le PhB induit une dépression de l'utilisation de glucose dans le système visuel particulièrement importante au début du développement postnatal qui persiste à l'âge adulte dans deux structures sur trois. La maturation du système visuel se situe vers le 15e jour postnatal et se traduit par une augmentation significative de l'utilisation de glucose dans le noyau genouillé latéral entre 14 et 17 jours dans les deux groupes d'animaux (Nehlig et Coll., 1988a, 1988b ; figure 7). De plus, chez les animaux traités au PhB, l'utilisation de glucose augmente également dans les deux autres structures du système visuel. Il semble donc que le PhB pourrait ne pas affecter au plan métabolique la maturation de la fonction visuelle. Celle-ci est plus

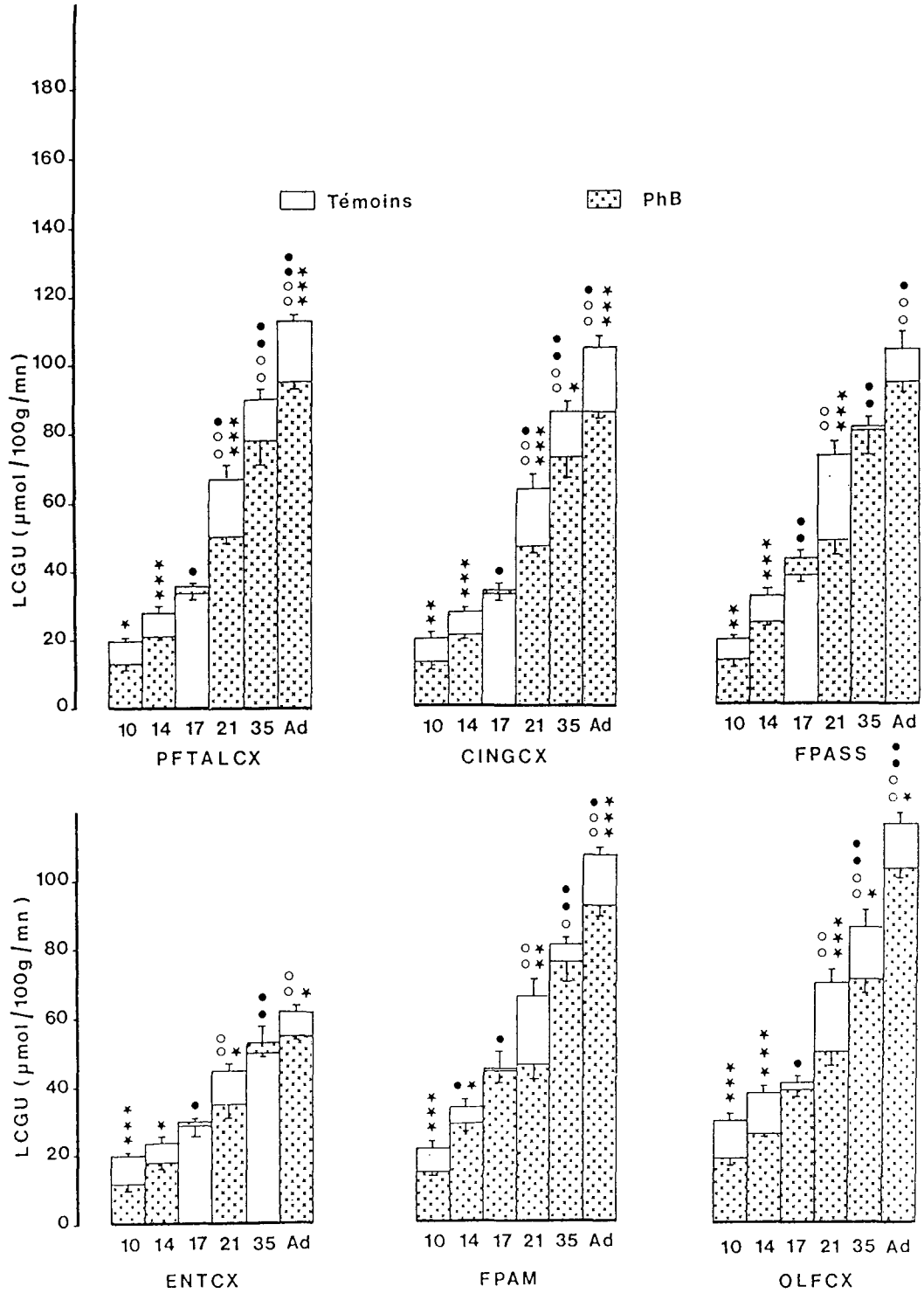


Figure 8 : Effets d'un traitement chronique précoce au PhB sur l'évolution postnatale de l'utilisation de glucose dans les aires corticales.
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins à un stade donné du développement (test t de Student) ;
o $p < 0,05$, oo $p < 0,01$, différences statistiquement significatives entre un stade du développement et le stade précédent chez les témoins ;
● $p < 0,05$, ●● $p < 0,01$, différences statistiquement significatives entre un stade du développement et le stade précédent chez les rats traités au PhB (test t de Bonferroni).
Abréviations : Ad : adulte ; PFTALCX : cortex préfrontal ; CINGCX: cortex cingulaire ; ENTCX : cortex entorhinal ; FPASS : aire somatosensorielle du cortex frontopariétal ; FPAM : aire motrice du cortex frontopariétal ; OLFCX : cortex olfactif.

tardive que la maturation de la fonction auditive et se produit dans une période où les taux d'utilisation cérébrale de glucose augmentent de manière importante chez les animaux traités au PhB et sont identiques aux valeurs des témoins au stade de 17 jours.

3.4. Effets à court et à long terme du phénobarbital sur l'utilisation cérébrale de glucose dans les aires corticales, l'hippocampe et le cervelet

Plusieurs études concernant les effets d'un traitement précoce au PhB chez le rat ou la souris ont permis de montrer que certaines structures cérébrales sont particulièrement sensibles aux effets du médicament. En effet, chez la souris des déficits neuromorphologiques spécifiques ont été mis en évidence après une exposition en période pré ou postnatale essentiellement au niveau du cervelet et de l'hippocampe mais également au niveau du cortex cérébral (Yanai, 1984).

De plus, une exposition précoce au PhB induit des déficits à long terme du comportement. Pick et Yanai (1984, 1985) ont rapporté des perturbations de la mémoire spatiale et des comportements liés à l'hippocampe chez des souris traitées au PhB en période pré ou postnatale.

3.4.1. Aires corticales

3.4.1.1. Evolution postnatale chez les témoins

Chez les témoins, les taux d'UCLG ne varient pas significativement de 10 à 17 jours dans les 6 structures représentées sur la figure 8. Entre 17 et 21 jours, l'utilisation de glucose augmente d'environ 100 % dans le cortex préfrontal, le cortex cingulaire et l'aire somatosensorielle du cortex frontopariétal et de 50 à 70 % dans le cortex entorhinal, le cortex olfactif et l'aire motrice du cortex frontopariétal. L'utilisation de glucose s'accroît significativement

entre 21 et 35 jours et 35 jours et l'adulte dans les 6 structures corticales, sauf dans l'aire somatosensorielle du cortex frontopariétal et dans le cortex entorhinal entre 21 et 35 jours (test t de Bonferroni) (figure 8).

Vers le 17e jour postnatal, les animaux sont capables d'explorer leur environnement et la variété de leurs activités ludiques sont le reflet de comportements organisés impliquant la participation du néocortex et en particulier des aires corticales (Tilney, 1933). La plupart des caractéristiques du comportement du rat adulte sont apparentes chez le jeune rat de 20 jours et se traduisent par une augmentation généralisée de l'utilisation de glucose dans l'ensemble des structures cérébrales et plus particulièrement au niveau des aires corticales. Après le sevrage, la maturation cérébrale du rat est encore très active, le cortex cérébral n'a pas atteint sa spécialisation structurale complète à 21 jours et l'utilisation de glucose s'accroît encore significativement dans la plupart des aires corticales après 21 jours. En effet, les activités ludiques des animaux sont totalement développées vers 35 jours et la maturité sexuelle est atteinte vers 50-60 jours (Tilney, 1933). De plus, les caractéristiques de l'activité électrique corticale atteignent leur niveau adulte à la fin de la 8e semaine (Deza et Eidelberg, 1967).

3.4.1.2. Effets du phénobarbital

Chez les animaux traités au PhB, l'UCLG augmente de manière significative entre 14 et 17 jours dans toutes les structures et entre 17 et 21 jours uniquement dans le cortex préfrontal et le cortex cingulaire. L'utilisation de glucose s'accroît significativement dans les 6 aires corticales entre 21 et 35 jours et 35 jours et le stade adulte, sauf dans le cortex entorhinal entre 35 jours et le stade adulte (test t de Bonferroni) (figure 8).

Un traitement précoce au PhB induit une dépression des taux d'utilisation de glucose dans les aires corticales à tous les stades étudiés sauf à 17 jours. Chez les animaux traités au PhB, l'utilisation

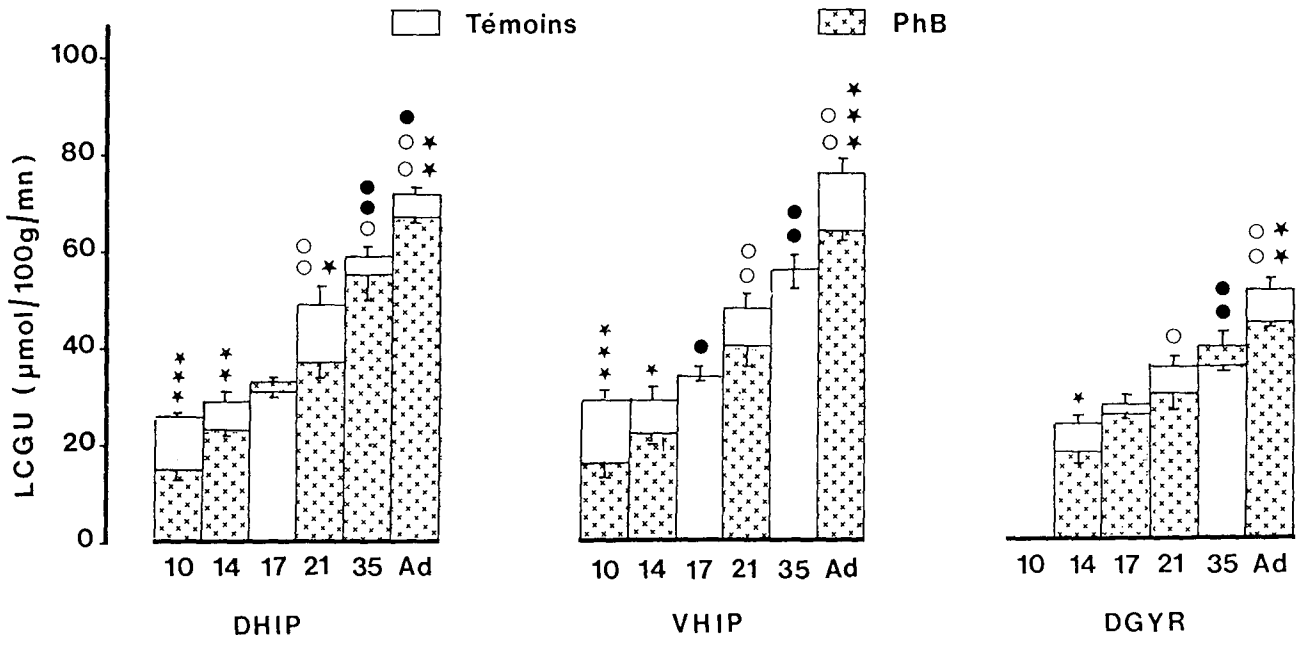


Figure 9 : Effets d'un traitement chronique précoce au PhB sur l'évolution postnatale de l'utilisation de glucose dans les structures de l'hippocampe.
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins à un stade donné du développement (test t de Student) ;
o $p < 0,05$, oo $p < 0,01$, différences statistiquement significatives entre un stade du développement et le stade précédent chez les témoins ; ● $p < 0,05$, ●● $p < 0,01$, différences statistiquement significatives entre un stade du développement et le stade précédent chez les rats traités au PhB (test t de Bonferroni).
Abréviations : Ad : adulte ; DHIP : hippocampe dorsal ; VHIP : hippocampe ventral ; DGYR : gyrus denté.

de glucose est significativement réduite de 15 à 40 % par rapport aux témoins dans les 6 aires corticales à 10, 14 et 21 jours. Chez l'adulte, la diminution de l'utilisation de glucose persiste chez les animaux traités au PhB et est significative dans 5 des 6 structures corticales (test t de Student) (figure 8).

3.4.2. Hippocampe

Comme le montre la figure 9, chez les témoins, l'UCLG augmente significativement entre 17 et 21 jours dans les trois structures, c'est-à-dire la région CA3 de l'hippocampe dorsal et ventral et le gyrus denté. Entre 21 et 35 jours, l'utilisation de glucose s'accroît significativement dans l'hippocampe dorsal et entre 35 jours et le stade adulte, dans les trois structures étudiées (test t de Bonferroni).

Chez les animaux traités au PhB, l'UCLG augmente entre 14 et 17 jours dans l'hippocampe ventral puis entre 21 et 35 jours dans les trois structures. Entre 35 jours et le stade adulte, l'utilisation de glucose s'accroît significativement dans l'hippocampe dorsal (test t de Bonferroni) (figure 9).

Un traitement précoce au PhB induit une diminution significative de l'utilisation de glucose dans les trois régions de l'hippocampe à 10 et 14 jours et ainsi qu'au stade adulte. A 10 jours, les valeurs sont significativement diminuées de 42 et 45 % respectivement dans l'hippocampe dorsal et ventral chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins. Par contre, à 17, 21 et 35 jours aucune différence n'apparaît entre les deux groupes d'animaux sauf à 21 jours où l'UCLG est diminuée dans l'hippocampe dorsal des animaux traités au PhB par rapport aux témoins. Chez l'animal adulte, l'utilisation de glucose est significativement diminuée de 7 à 16 % dans les trois structures de l'hippocampe après un traitement précoce au PhB (test t de Student) (figure 9).

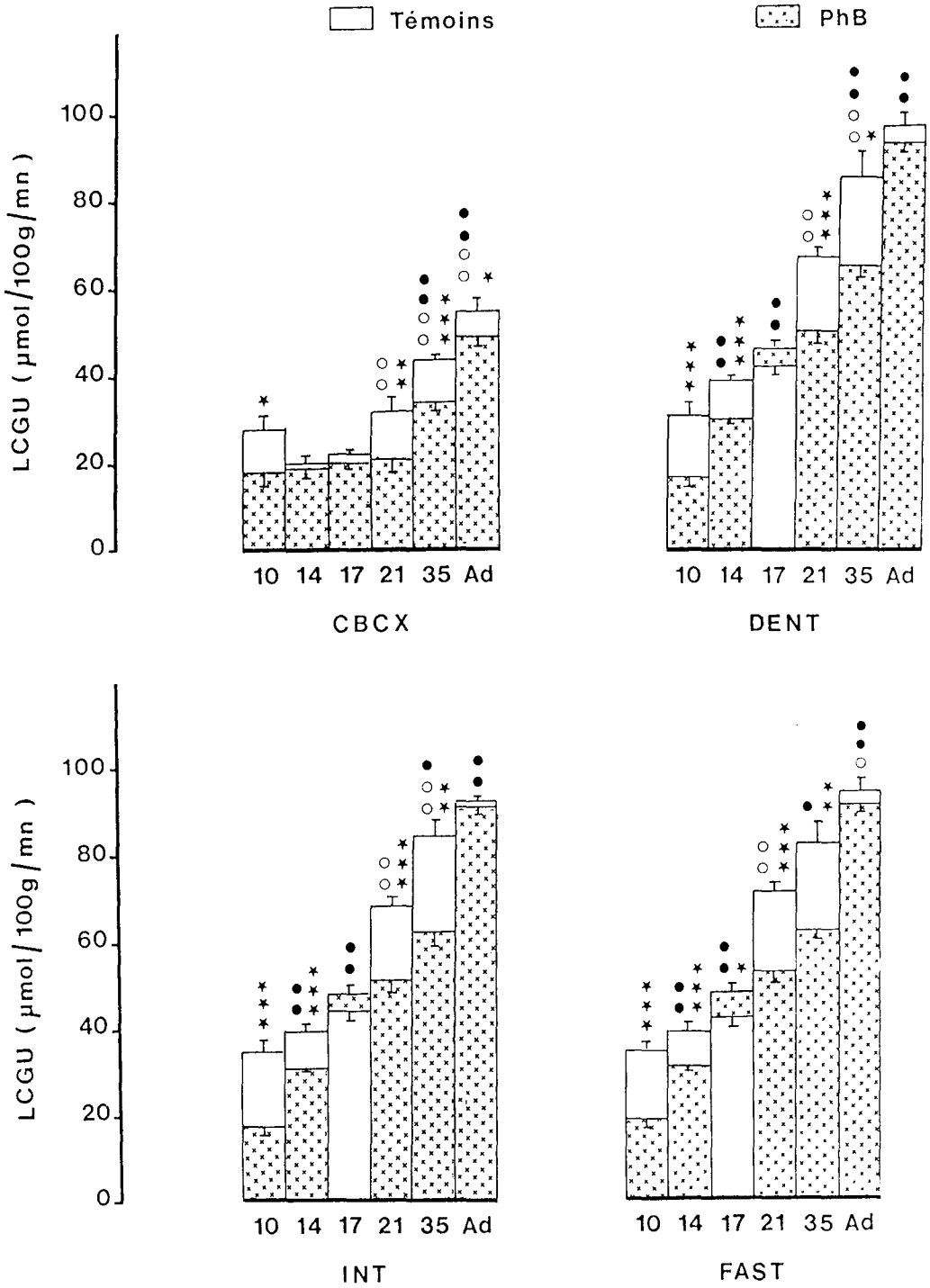


Figure 10 : Effets d'un traitement chronique précoce au PhB sur l'évolution postnatale de l'utilisation de glucose dans le cervelet.
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $p < 0,001$, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins à un stade donné du développement (test t de Student) ;
○ $p < 0,05$, ○○ $p < 0,01$, différences statistiquement significatives entre un stade du développement et le stade précédent chez les témoins ;
● $p < 0,05$, ●● $p < 0,01$, différences statistiquement significatives entre un stade du développement et le stade précédent chez les rats traités au PhB (test t de Bonferroni).
Abréviations : Ad : adulte ; CBCX : cortex cérébelleux; DENT : noyau dentelé ; INT : noyau interposé ; FAST : noyau fastigial.

3.4.3. Cervelet

Chez les témoins, l'utilisation de glucose augmente significativement à partir du 17e jour postnatal dans les 4 structures du cervelet représentées sur la figure 10, c'est-à-dire le cortex cérébelleux et les noyaux du cervelet sauf dans le noyau fastigial entre 21 et 35 jours et les noyaux dentelé et interposé entre 35 jours et le stade adulte (test t de Bonferroni) (figure 10).

Chez les animaux traités au PhB, l'utilisation de glucose s'accroît significativement entre 10 et 14 jours et entre 14 et 17 jours dans les trois noyaux du cervelet puis entre 21 et 35 jours et entre 35 jours et le stade adulte dans les 4 structures du cervelet (test t de Bonferroni) (figure 10).

Un traitement précoce au PhB induit une dépression des taux d'utilisation de glucose à 10, 14, 21 et 35 jours dans les quatre structures du cervelet étudiées sauf dans le cortex cérébelleux à 14 jours. La réduction de l'UCLG observée chez les animaux traités au PhB est particulièrement importante à 10 jours puisqu'elle varie de 45 à 50 % dans les noyaux du cervelet par rapport aux témoins. Cependant, le PhB n'affecte pas à long terme l'utilisation de glucose dans les noyaux du cervelet. Par contre, dans le cortex cérébelleux, l'utilisation de glucose est significativement diminuée de 11 % chez les rats adultes traités au PhB par rapport aux témoins (test t de Student) (figure 10).

3.4.4. Effets à long terme du phénobarbital sur l'utilisation de glucose dans les différentes couches cellulaires de l'hippocampe et du cervelet du rat adulte

La localisation des différentes couches cellulaires de l'hippocampe et du cervelet est illustrée sur les figures 11 et 12.

Un traitement précoce au PhB n'affecte pas à long terme l'utilisation de glucose dans les différentes couches cellulaires de l'hippocampe (tableau 2). Cependant, on observe une diminution de 9,3 %

TABLEAU 2 : EFFETS A LONG TERME DU PHENOBARBITAL SUR L'UTILISATION DE GLUCOSE DANS LES DIFFERENTES COUCHES CELLULAIRES DE L'HIPPOCAMPE ET DU CERVELET DU RAT ADULTE.
Les valeurs représentent des moyennes ± E.S.M. du nombre d'animaux entre parenthèse: exprimées en µmol/100 g/mn.

	Témoins (n=6)	Phénobarbital (n=6)
Hippocampe		
Région CA1		
Stratum oriens	58 ± 2	58 ± 1
Cellules pyramidales	70 ± 3	68 ± 1
Stratum radiatum	66 ± 2	63 ± 1
Région CA3		
Stratum oriens	58 ± 2	56 ± 1
Cellules pyramidales	74 ± 3	69 ± 1
Stratum radiatum	69 ± 3	68 ± 1
Couche moléculaire (lacunosum)	88 ± 3	88 ± 2
Gyrus denté		
Couche moléculaire	54 ± 1	57 ± 1
Couche granulaire	48 ± 1	51 ± 2
Cervelet		
Couche moléculaire	59 ± 3	61 ± 2
Couche granulaire	63 ± 3	63 ± 2
Matière blanche	38 ± 2	41 ± 1*

* $p < 0,05$, différence statistiquement significative par rapport aux témoins (test de Student).

de l'UCLG dans les cellules pyramidales de la région CA3 de l'hippocampe ($p < 0,10$, test t de Student). De même, un tel traitement n'affecte pas l'utilisation de glucose dans les différentes couches cellulaires du cervelet du rat adulte sauf dans la matière blanche qui présente une utilisation de glucose augmentée chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins (tableau 2).

3.4.5. Effets à long terme du phénobarbital sur le cervelet, l'hippocampe et le cortex cérébral : déficits neuromorphologiques, comportement et métabolisme énergétique

Yanai et ses collaborateurs ont montré chez la souris que le déficit de croissance cérébrale observé après un traitement précoce au PhB (Diaz et Schain, 1977 ; Schain et Watanabe, 1975) s'accompagne de déficits neuromorphologiques à long terme principalement au niveau du cervelet et de l'hippocampe. En effet, un traitement prénatal au PhB induit un déficit de 30 % du nombre des cellules de Purkinje du cervelet et de 15 % du nombre des cellules pyramidales de l'hippocampe chez la souris âgée de 50 jours (Bergman et Coll., 1980 ; Yanai et Coll., 1979). L'administration de PhB en période néonatale induit chez la souris non seulement une réduction de 35 % du nombre des cellules de Purkinje du cervelet et des cellules pyramidales de l'hippocampe mais également une diminution de 22 à 33 % du nombre des cellules granulaires du cervelet et de l'hippocampe. De plus, le nombre des cellules du cortex cérébral est également diminué après une exposition néonatale au PhB. Ces déficits cellulaires sont associés à une réduction des territoires occupés par les différentes couches cellulaires dans ces trois structures cérébrales (Yanai et Bergman, 1981). Chez le rat, les études sont moins nombreuses, Hannah et Coll. (1982, 1988) ont étudié uniquement les effets à court terme du PhB sur le nombre des cellules de Purkinje du cervelet et montrent un déficit de 20 % du nombre de ces cellules chez le rat de 21 jours ainsi que des perturbations à court et à long terme de l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje. Une étude récente a également permis de montrer des déficits à long terme de l'arborisation dendritique des cellules de la couche CA1 de l'hippocampe chez le rat traité in utero au PhB (Jacobson et Coll., 1988).

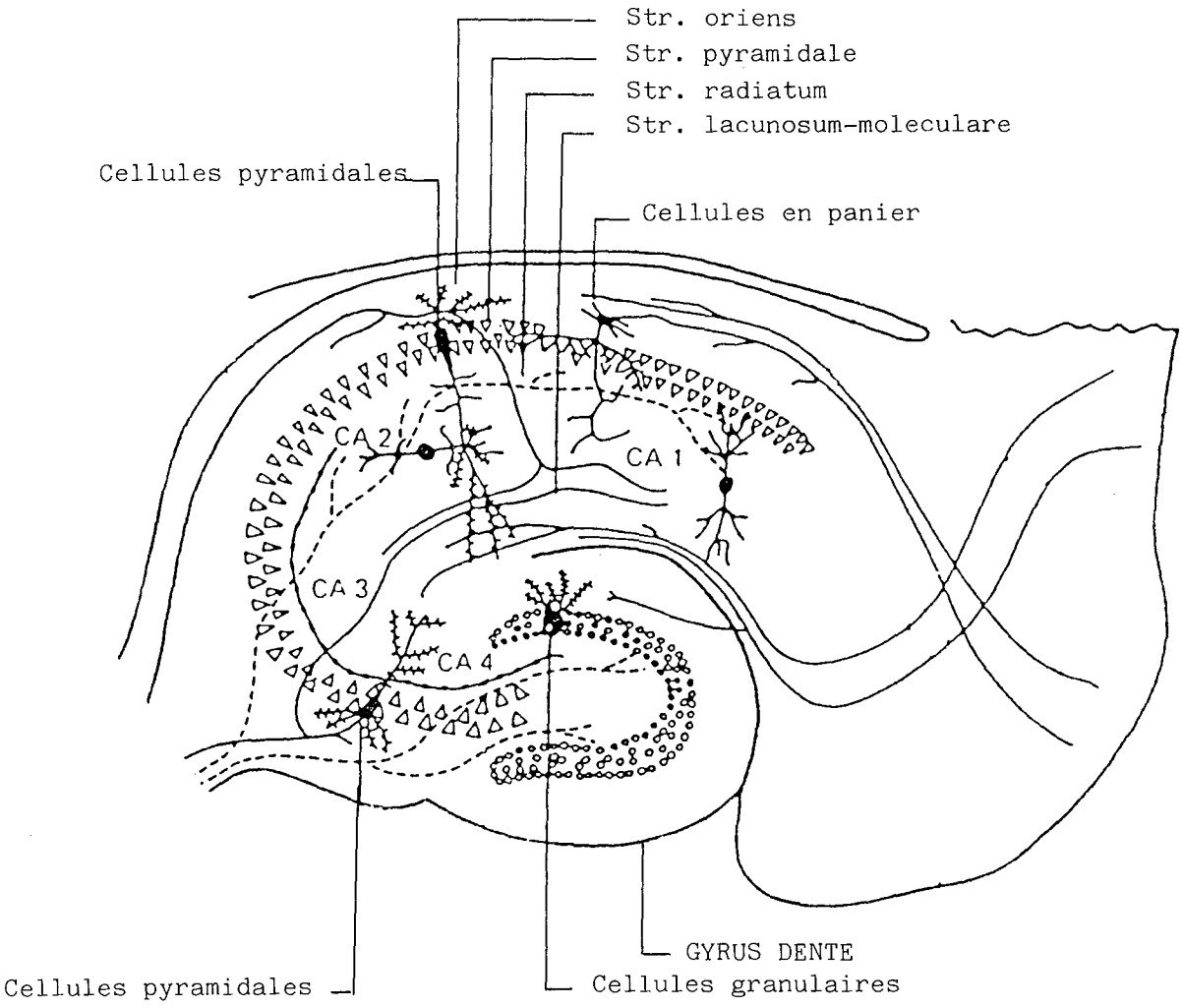


Figure 11 : Représentation des différentes couches cellulaires de l'hippocampe (d'après Hoffman et Zamir, 1984).

De plus, une exposition précoce au PhB induit des déficits à long terme du comportement chez le rat ou la souris. Yanai et ses collaborateurs ont étudié en particulier les conséquences du PhB sur la mémoire spatiale et les comportements liés à l'hippocampe : l'alternance spontanée dans un labyrinthe en T et les performances dans un labyrinthe à 8 branches. Les animaux traités au PhB ont des performances réduites dans ces deux labyrinthes par rapport aux témoins (Pick et Yanai, 1984, 1985). Une exposition néonatale au PhB induit des déficits comportementaux plus importants qu'un traitement prénatal : cette différence pourrait être attribuée aux déficits cellulaires cérébraux plus étendus après un traitement néonatal au PhB. De même, chez le rat, nous avons mis en évidence une diminution du taux d'alternance spontanée dans un labyrinthe en T ainsi qu'une augmentation des temps pour réaliser les essais chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins. Dans un labyrinthe à 8 branches, les rats traités au PhB présentent des déficits transitoires du comportement au cours des deux premiers jours de test (Mémoires E et F, chap. 4).

Un traitement précoce au PhB induit une réduction des taux d'utilisation de glucose qui persistent chez l'adulte, en particulier au niveau de l'hippocampe et du cortex cérébral. Cependant, dans notre étude, l'utilisation de glucose n'est pas affectée par le PhB dans les différentes couches cellulaires du cervelet et de l'hippocampe. L'UCLG est diminuée uniquement dans la couche formée par les cellules pyramidales de la région CA3 de l'hippocampe chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins. Ces cellules sont particulièrement sensibles au PhB (Yanai, 1984 ; Yanai et Bergman, 1981 ; Yanai et Coll., 1979). Chez le rat, seule une réduction du nombre des cellules de Purkinje du cervelet a été mise en évidence après un traitement néonatal au PhB (Hannah et Coll., 1982, 1988). Cependant, dans notre étude, les taux d'UCLG ne sont pas affectés dans les couches moléculaires du cervelet (tableau 2). Il semble donc difficile d'établir une corrélation entre le métabolisme énergétique dans les différentes couches cellulaires du cervelet et les destructions cellulaires décrites au niveau de cette structure après une exposition précoce au PhB.

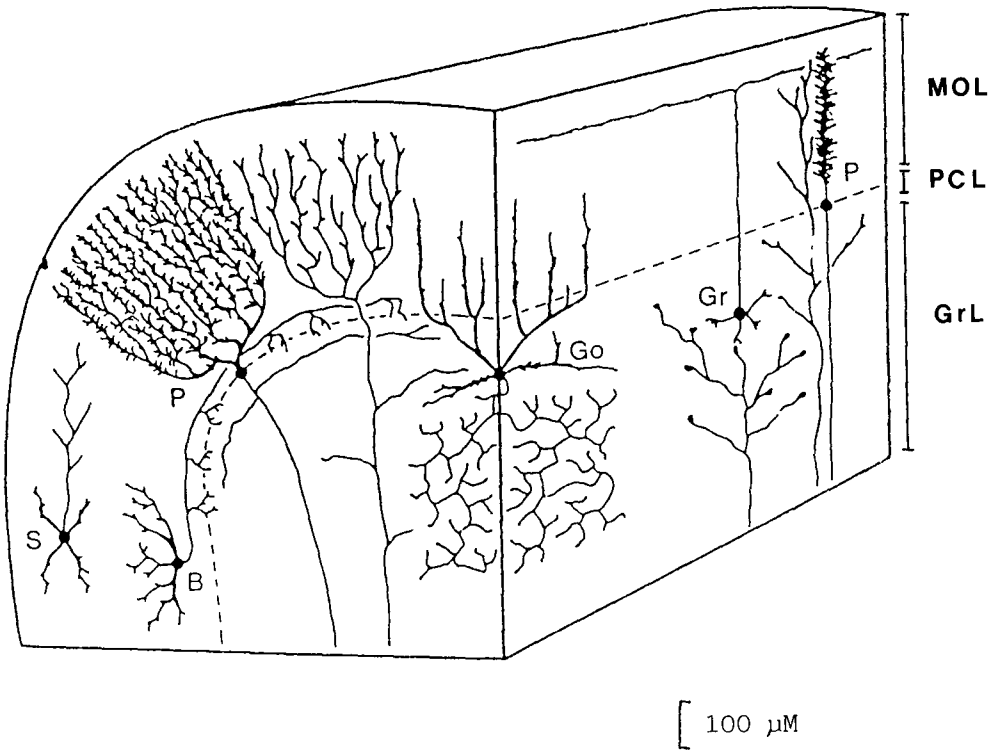


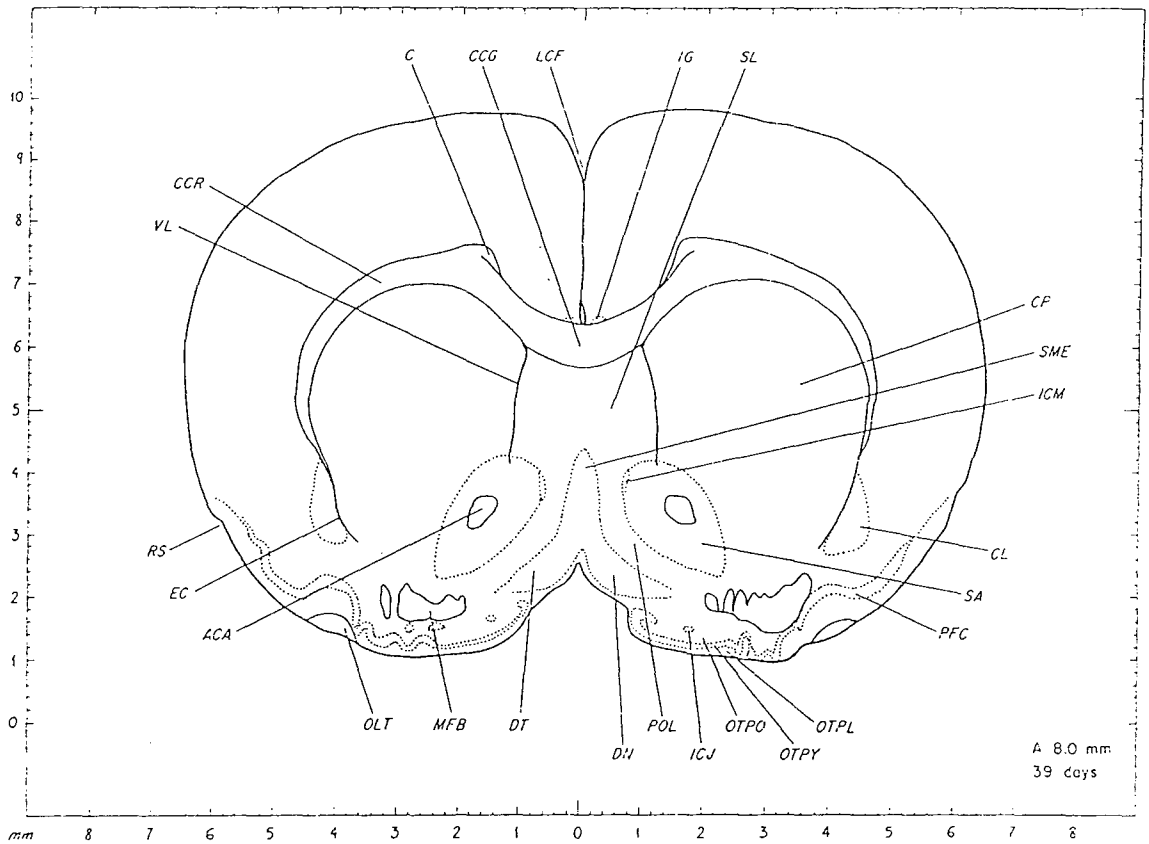
Figure 12 : Organisation neuronale du cortex cérébelleux. Les couches histologiques sont présentées sur la droite de la figure (d'après Stepherd, 1979). Abréviations : MOL, couche moléculaire; PCL, couche formée par les cellules de Purkinje; GrL, couche granulaire; P, cellules de Purkinje; Gr, cellules granulaires; S, cellules étoilées; B, cellules en panier; Go, cellules de Golgi.

Bien que l'hippocampe ait un rôle important dans la mémoire spatiale et les comportements en labyrinthes et que d'autre part, l'utilisation cérébrale de glucose soit réduite dans la région CA3 de l'hippocampe et le gyrus denté chez les animaux traités au PhB (figure 9), il est toutefois difficile de corréler les déficits comportementaux et les taux de métabolisme énergétique cérébral, en particulier au niveau des couches cellulaires de l'hippocampe chez les rats adultes traités au PhB en période néonatale.

En conclusion, un traitement chronique précoce au PhB induit une dépression à court terme de l'UCLG dans l'ensemble des structures cérébrales sauf à 17 jours. La diminution de l'utilisation cérébrale de glucose est particulièrement importante à 10 et 14 jours. De plus, le PhB pourrait retarder la maturation métabolique des structures impliquées dans le contrôle des fonctions dont l'acquisition est relativement précoce comme l'audition, alors que la maturation de la fonction visuelle qui est plus tardive semblerait moins sensible aux effets du PhB. Chez l'animal devenu adulte, la diminution du poids du cerveau s'accompagne d'une réduction à long terme des taux d'UCLG dans bon nombre de structures localisées dans différents systèmes, en particulier dans la région CA3 de l'hippocampe dorsal et ventral et le gyrus denté, dans le cortex cérébelleux ainsi que dans la plupart des aires corticales. Cependant, les résultats de notre étude n'ont pas permis d'établir de corrélations entre les destructions cellulaires décrites après une exposition néonatale au PhB chez le rat et le métabolisme énergétique cérébral, en particulier au niveau du cervelet.

ATLAS DE NEUROANATOMIE

LOCALISATION ANATOMIQUE DES STRUCTURES CEREBRALES ETUDIEES
SELON L'ATLAS DE SHERWOOD ET TIMIRAS (1970)
(RATS DE 39 JOURS) ET L'ATLAS DE PAXINOS
ET WATSON (1982) (RATS ADULTES)



ACA	Commissura anterior, pars anterior
C	Cingulum
CCG	Genu corporis callosi
CCR	Radiatio corporis callosi
CL	Claustrum
CP	Nucleus caudatus putamen
DN	Nucleus tractus diagonalis (Gyrus diagonalis)
DT	Tractus diagonalis (Diagonal band of Broca)
EC	Capsula externa
ICJ	Insulae Calleja
ICM	Insula Calleja magna
IG	Indusium griseum
LCF	Fissura longitudinalis cerebri
MFB	Fasciculus medialis telencephali (Medial forebrain bundle)
OLT	Tractus olfactorius lateralis
OTPL	Tuberculum olfactorium, lamina plexiformis
OTPO	Tuberculum olfactorium, lamina polymorphica
OTPY	Tuberculum olfactorium, lamina pyramidalis
PFC	Cortex piriformis
POL	Area preoptica lateralis
RS	Sulcus rhinalis
SA	Nucleus accumbens septi
SL	Nucleus lateralis septi
SME	Nucleus medialis septi
VL	Ventriculus lateralis

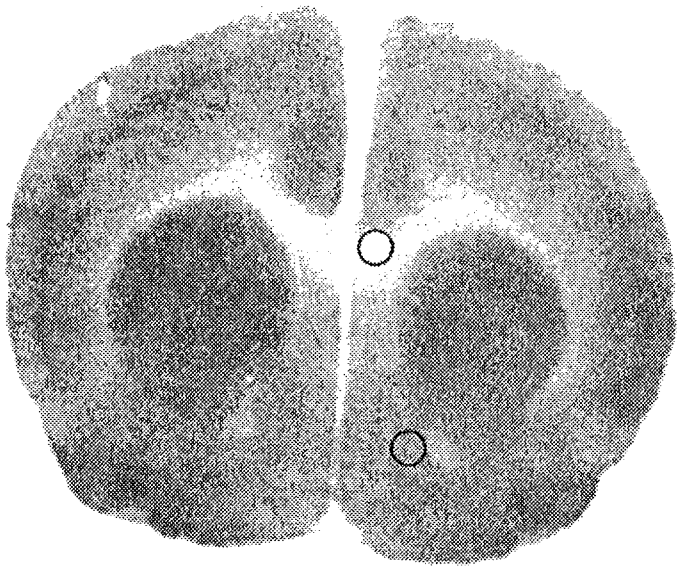
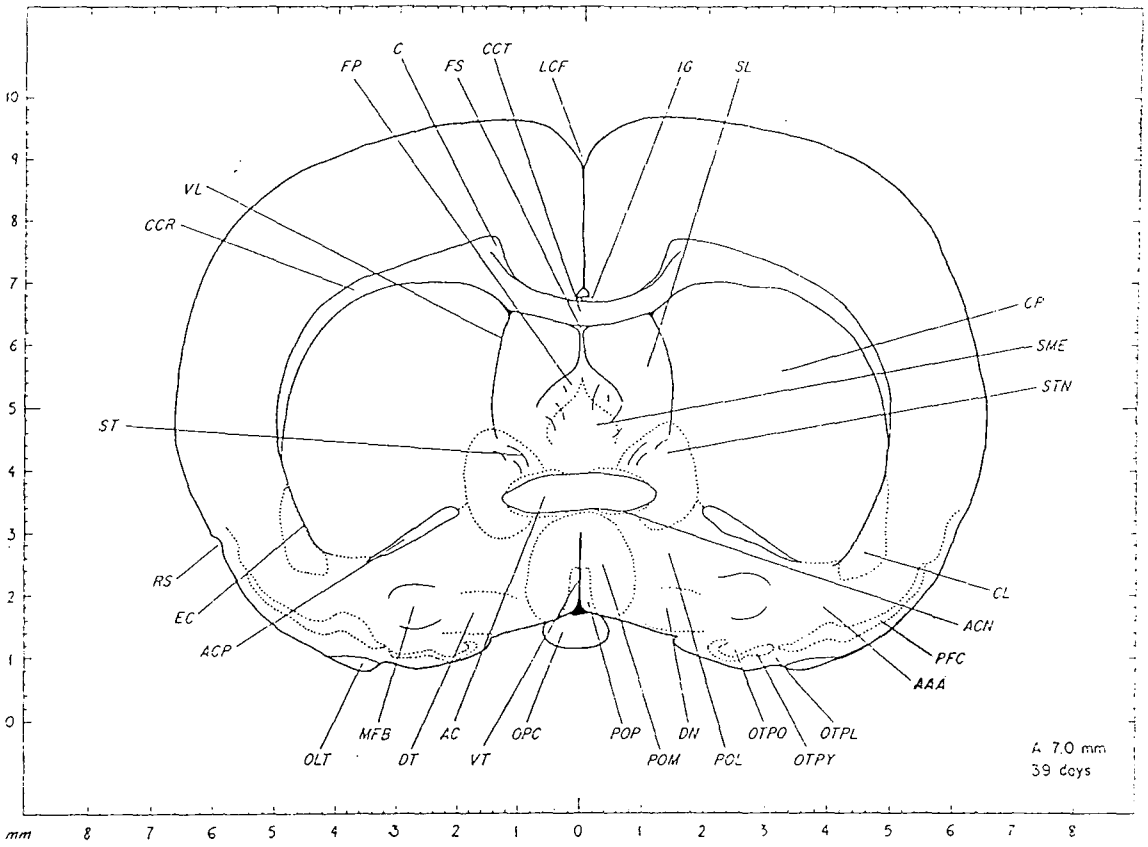


Figure I : Localisation du genou du corps calleux et du noyau accumbens



AAA Area amygdaloidea anterior
AC Commissura anterior
ACN Nucleus proprius commissurae anterioris
ACP Commissura anterior, pars posterior
C Cingulum
CCR Radiatio corporis callosi
CCT Truncus corporis callosi
CL Claustrum
CP Nucleus caudatus putamen
DN Nucleus tractus diagonalis (Gyrus diagonalis)
DT Tractus diagonalis (Diagonal band of Broca)
EC Capsula externa
FP Fornix precommissuralis
FS Fornix superior
IG Indusium griseum
LCF Fissura longitudinalis cerebri
MFB Fasciculus medialis telencephali (Medial forebrain bundle)
OLT Tractus olfactorius lateralis
OPC Chiasma opticum
OTPL Tuberculum olfactorium, lamina plexiformis
OTPO Tuberculum olfactorium, lamina polymorphica
OTPY Tuberculum olfactorium, lamina pyramidalis
PFC Cortex piriformis
POL Area preoptica lateralis
POM Area preoptica medialis
POP Area preoptica periventricularis
RS Sulcus rhinalis
SL Nucleus lateralis septi
SME Nucleus medialis septi
ST Stria terminalis
STN Nucleus proprius striae terminalis (Bed nucleus)
VL Ventriculus lateralis
VT Ventriculus tertius

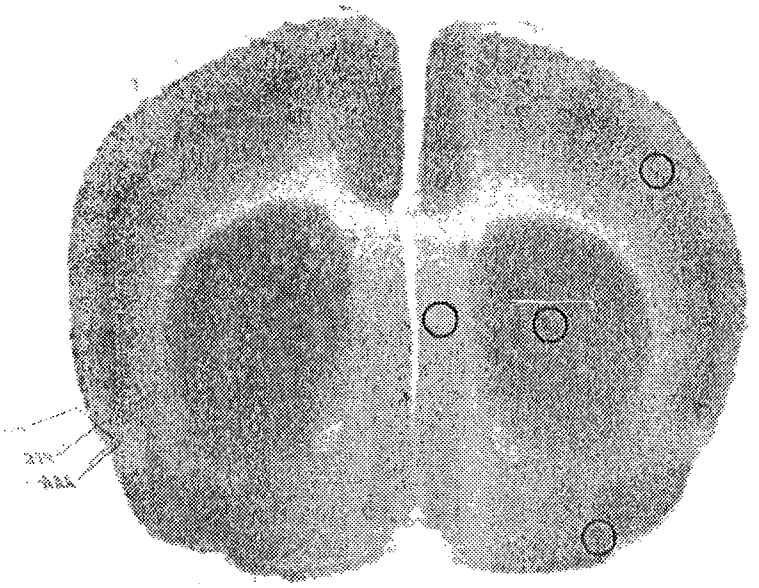
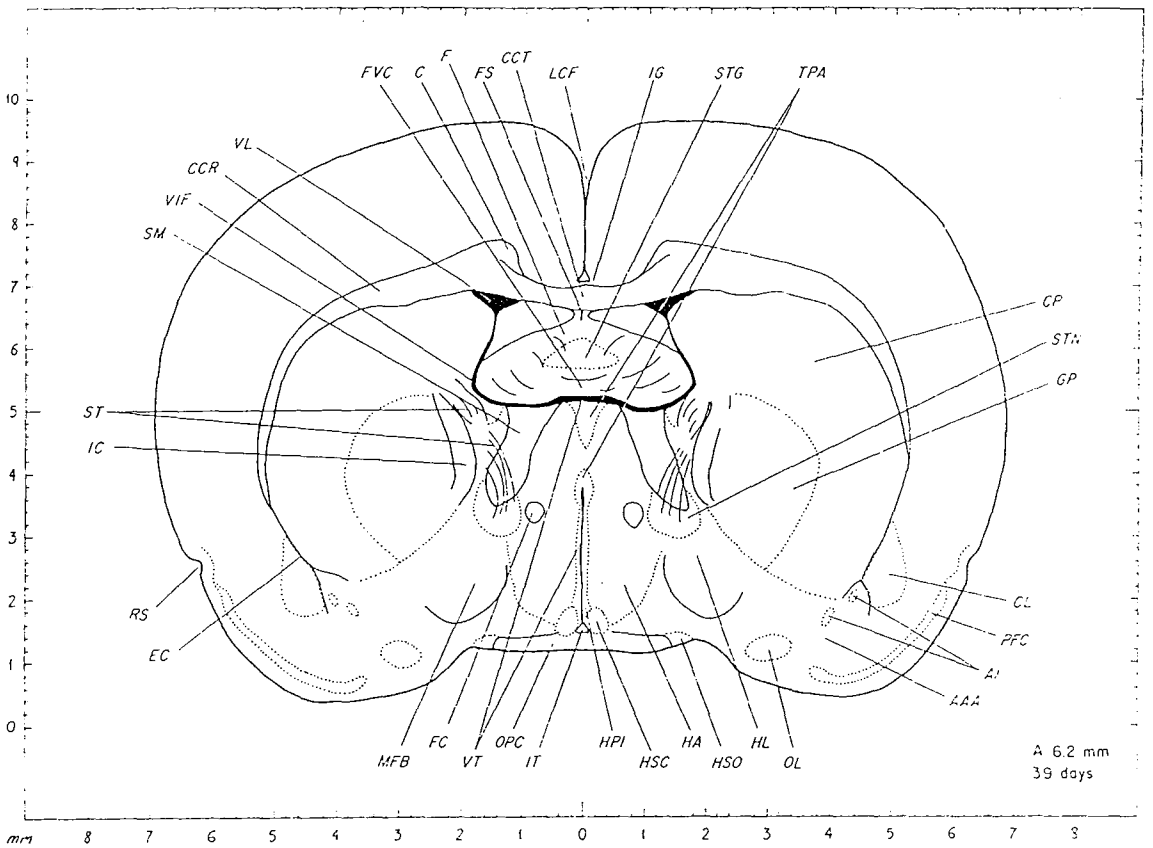


Figure II : Localisation du noyau caudé dorsomédian, du septum latéral, du cortex frontopariétal moteur et du cortex olfactif



AAA	Area amygdaloidea anterior
AI	Massa intercalatus (amygdaloideus)
C	Cingulum
CCR	Radiatio corporis callosi
CCT	Truncus corporis callosi
CL	Claustrum
CP	Nucleus caudatus putamen
EC	Capsula externa
F	Fornix
FC	Columna fornicis
FS	Fornix superior
FVC	Commissura fornicis ventralis (Commissura hippocampi ventralis)
GP	Globus pallidus
HA	Nucleus anterior (hypothalami)
HL	Nucleus lateralis (hypothalami)
HPI	Nucleus periventricularis (hypothalami)
HSC	Nucleus suprachiasmaticus (hypothalami)
HSO	Nucleus supraopticus (hypothalami)
IC	Capsula interna
IG	Indusium griseum
IT	Tractus infundibularis
LCF	Fissura longitudinalis cerebri
MFB	Fasciculus medialis telencephali (Medial forebrain bundle)
OL	Nucleus tractus olfactorii lateralis
OPC	Chiasma opticum
PFC	Cortex piriformis
RS	Sulcus rhinalis
SM	Stria medullaris thalami
ST	Stria terminalis
STG	Nucleus triangularis septi
STN	Nucleus proprius striae terminalis (Bed nucleus)
TPA	Nucleus paraventricularis (thalami)
VIF	Foramen interventriculare
VL	Ventriculus lateralis
VT	Ventriculus tertius

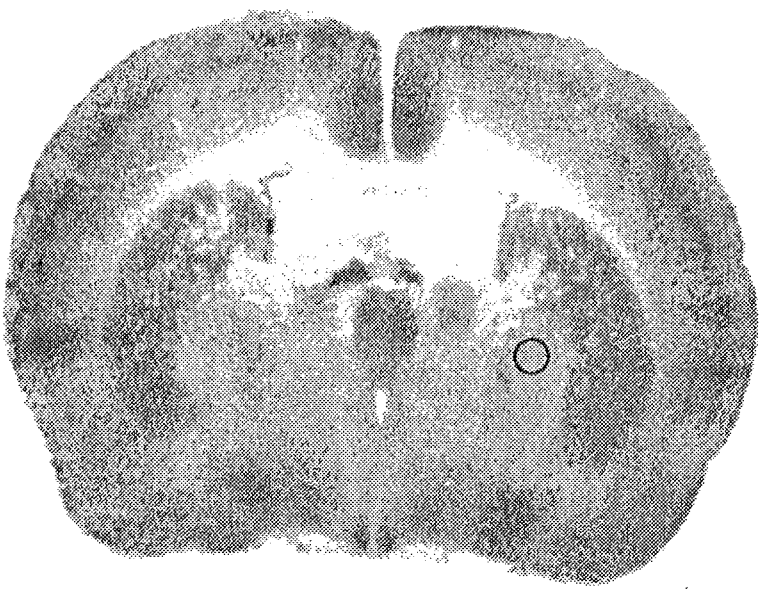
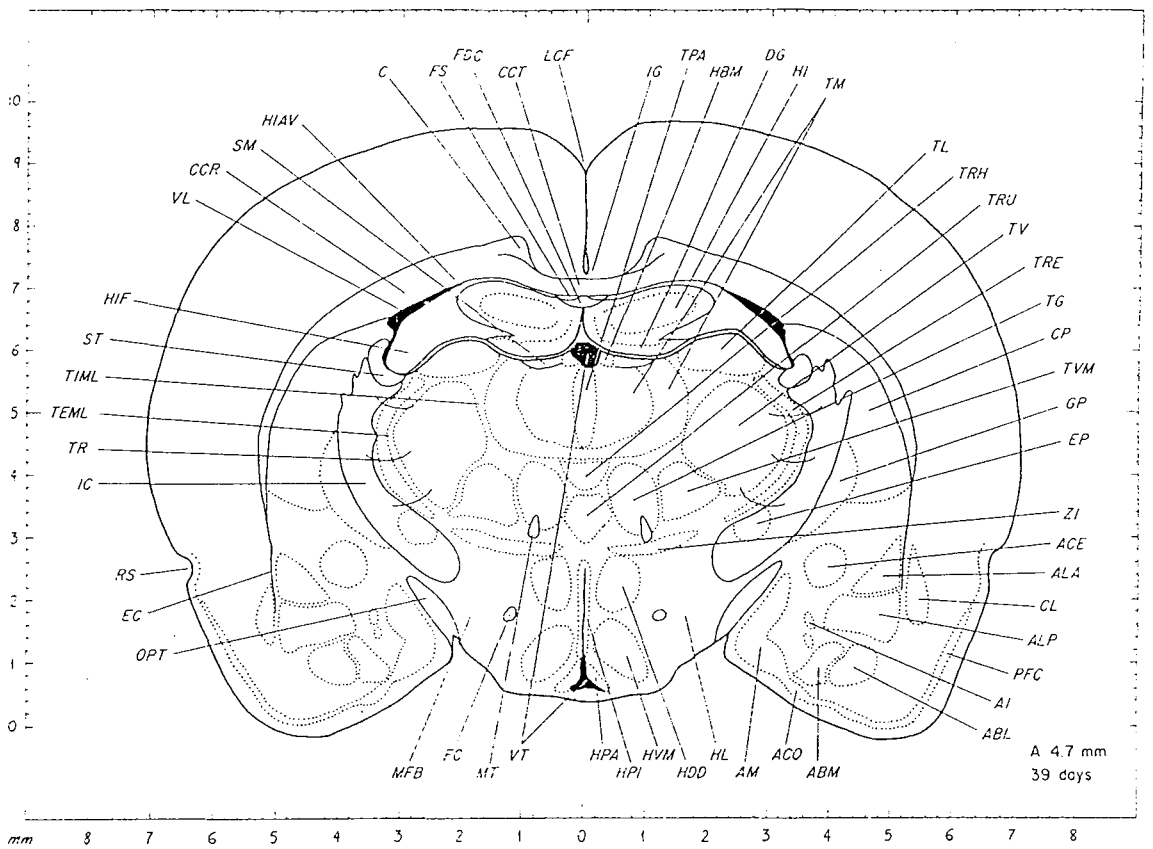


Figure III : Localisation du globus pallidus



ABL	Nucleus basalis, pars lateralis (amygdaloideus)
ABM	Nucleus basalis, pars medialis (amygdaloideus)
ACE	Nucleus centralis (amygdaloideus)
ACO	Nucleus corticalis (amygdaloideus)
AI	Massa intercalatus (amygdaloideus)
ALA	Nucleus lateralis, pars anterior (amygdaloideus)
ALP	Nucleus lateralis, pars posterior (amygdaloideus)
AM	Nucleus medialis (amygdaloideus)
C	Cingulum
CCR	Radiatio corporis callosi
CCT	Truncus corporis callosi
CL	Claustrum
CP	Nucleus caudatus putamen
DG	Gyrus dentatus
EC	Capsula externa
EP	Nucleus entopeduncularis
FC	Columna fornicis
FDC	Commissura fornicis dorsalis (Commissura hippocampi dorsalis)
FS	Fornix superior
GP	Globus pallidus
HBM	Nucleus habenularis medialis
HDD	Nucleus dorsomedialis, pars dorsalis (hypothalami)
HI	Hippocampus
HIAV	Alveus hippocampi
HIF	Fimbria hippocampi
HL	Nucleus lateralis (hypothalami)
HPA	Nucleus periventricularis arcuatus (hypothalami)
HPI	Nucleus periventricularis (hypothalami)
HVM	Nucleus ventromedialis (hypothalami)
IC	Capsula interna
IG	Indusium griseum
LCF	Fissura longitudinalis cerebri
MFB	Fasciculus medialis telencephali (Medial forebrain bundle)
MT	Fasciculus mamillothalamicus
OPT	Tractus opticus
PFC	Cortex piriformis
RS	Sulcus rhinalis
SM	Stria medullaris thalami
ST	Stria terminalis
TEML	Lamina medullaris externa thalami
TG	Nucleus gelatinosus (thalami)
TIML	Lamina medullaris interna thalami
TL	Nucleus lateralis (thalami)
TM	Nucleus medialis (thalami)
TPA	Nucleus paraventricularis (thalami)
TR	Radiatio thalami
TRE	Nucleus reticularis (thalami)
TRH	Nucleus rhomboideus (thalami)
TRU	Nucleus reuniens (thalami)
TV	Nucleus ventralis (thalami)
TVM	Nucleus ventralis medialis (thalami)
VL	Ventriculus lateralis
VT	Ventriculus tertius
ZI	Zona incerta

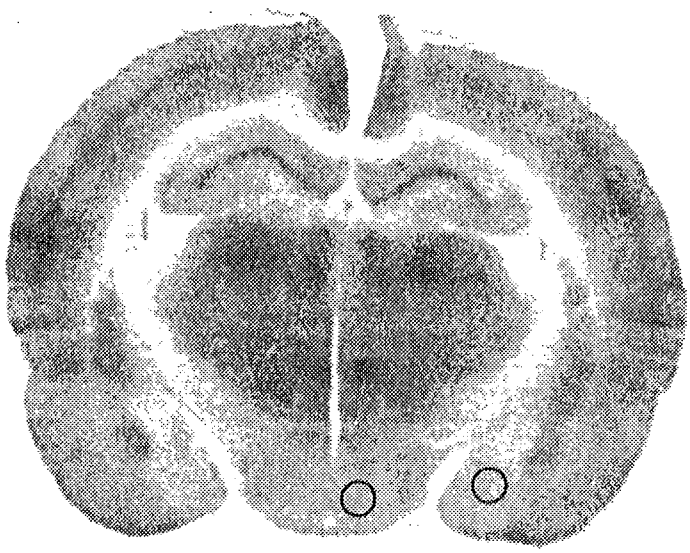
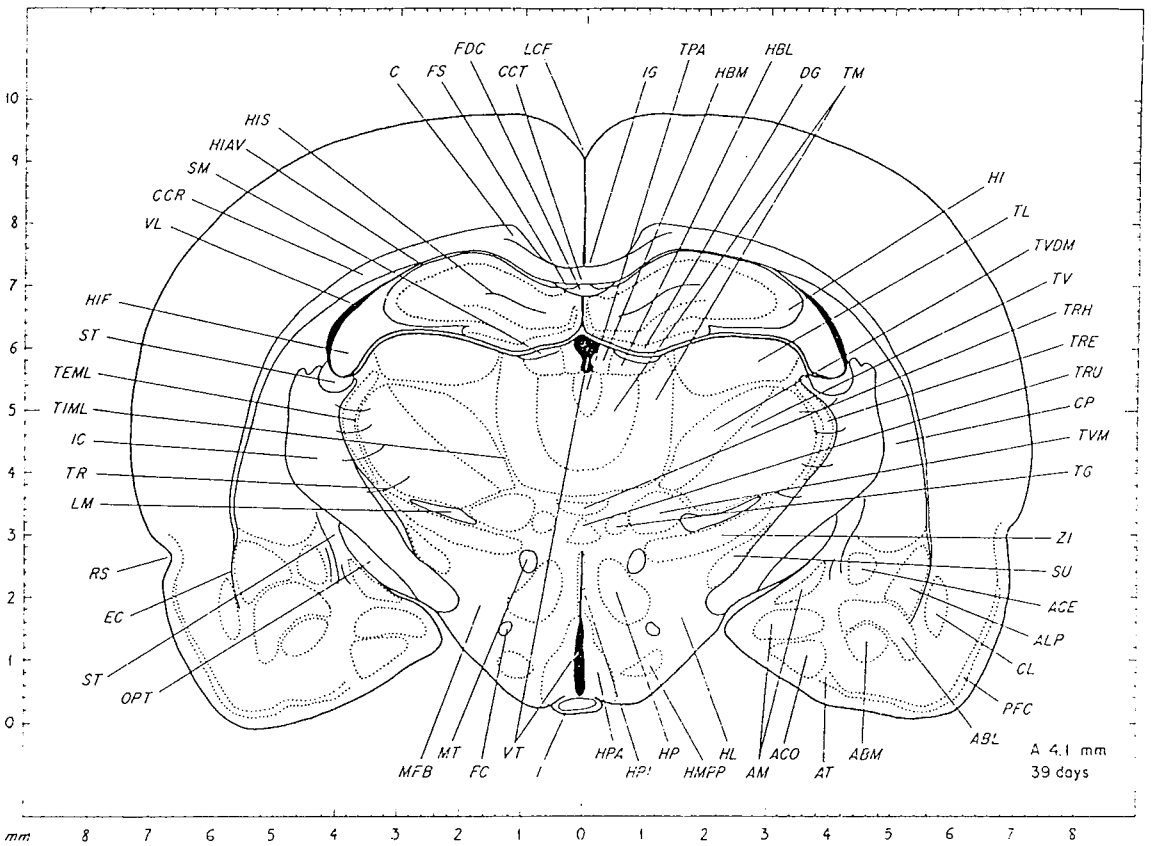
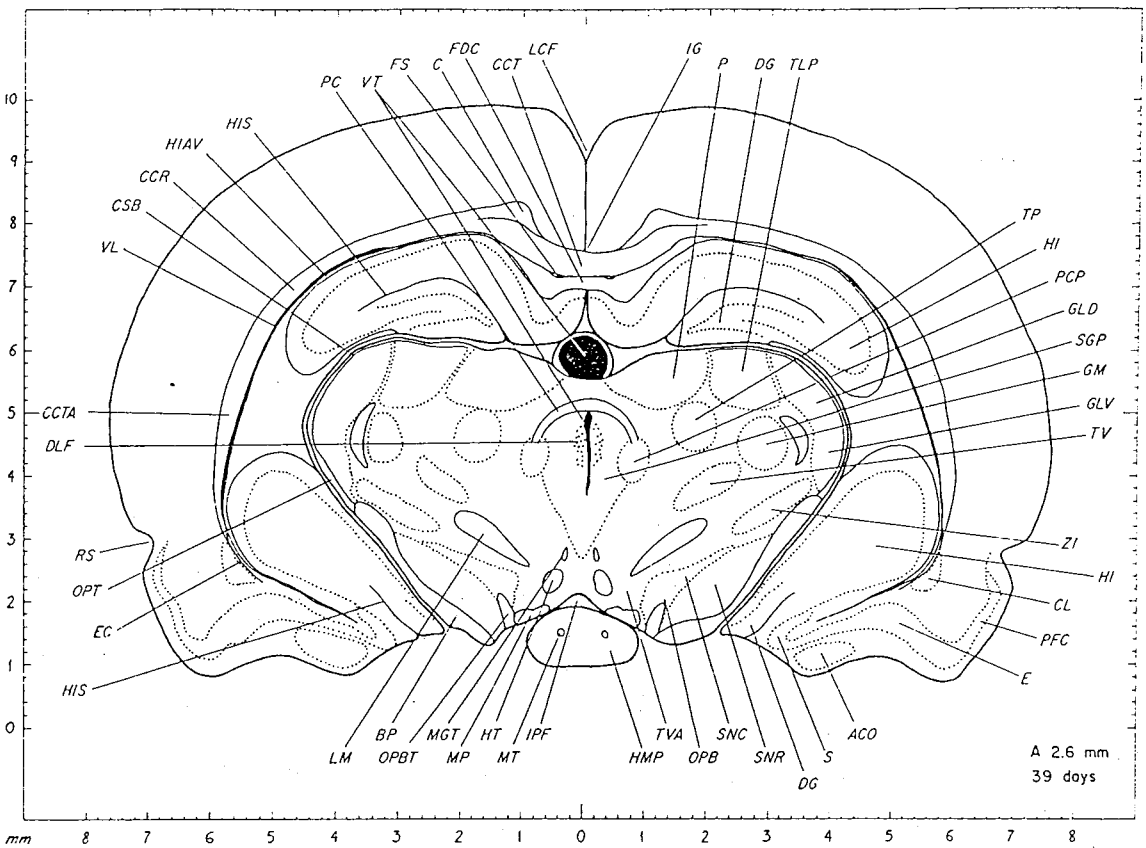


Figure IV : Localisation de l'amygdale médiane et de l'hypothalamus ventromédian



ABL	Nucleus basalis, pars lateralis (amygdaloideus)
ABM	Nucleus basalis, pars medialis (amygdaloideus)
ACE	Nucleus centralis (amygdaloideus)
ACO	Nucleus corticalis (amygdaloideus)
ALP	Nucleus lateralis, pars posterior (amygdaloideus)
AM	Nucleus medialis (amygdaloideus)
AT	Area transitionalis
C	Cingulum
CCR	Radiatio corporis callosi
CCT	Truncus corporis callosi
CL	Claustrum
CP	Nucleus caudatus putamen
DG	Gyrus dentatus
EC	Capsula externa
FC	Columna fornicis
FDC	Commissura fornicis dorsalis (Commissur. hippocampi dorsalis)
FS	Fornix superior
HBL	Nucleus habenularis lateralis
HBM	Nucleus habenularis medialis
HI	Hippocampus
HIAV	Alveus hippocampi
HIF	Fimbria hippocampi
HIS	Sulcus hippocampi
HL	Nucleus lateralis (hypothalami)
HMPP	Nucleus premamillaris (hypothalami)
HP	Nucleus posterior (hypothalami)
HPA	Nucleus periventricularis arcuatus (hypothalami)
HPI	Nucleus periventricularis (hypothalami)
I	Infundibulum
IC	Capsula interna
IG	Indusium griseum
LCF	Fissura longitudinalis cerebri
LM	Lemniscus medialis
MFB	Fasciculus medialis telencephali (Medial forebrain bundle)
MT	Fasciculus mamillothalamicus
OPT	Tractus opticus
PFC	Cortex piriformis
RS	Sulcus rhinalis
SM	Stria medullaris thalami
ST	Stria terminalis
SU	Nucleus subthalamicus
TEML	Lamina medullaris externa thalami
TG	Nucleus gelatinosus (thalami)
TIML	Lamina medullaris interna thalami
TL	Nucleus lateralis (thalami)
TM	Nucleus medialis (thalami)
TPA	Nucleus paraventricularis (thalami)
TR	Radiatio thalami
TRE	Nucleus reticularis (thalami)
TRH	Nucleus rhomboideus (thalami)
TRU	Nucleus reuniens (thalami)
TV	Nucleus ventralis (thalami)
TVDM	Nucleus ventralis, pars dorsomedialis (thalami)
TVM	Nucleus ventralis medialis (thalami)
VL	Ventriculus lateralis
VT	Ventriculus tertius
ZI	Zona incerta

Figure V : Localisation du thalamus dorsomédian, du thalamus ventroantérieur, du thalamus ventrolatéral et de la capsule interne



ACO	Nucleus corticalis (amygdaloideus)
BP	Basis pedunculi
C	Cingulum
CCR	Radiatio corporis callosi
CCT	Truncus corporis callosi
CCTA	Tapetum corporis callosi
CL	Claustrum
CSB	Brachium colliculi superioris
DG	Gyrus dentatus
DLF	Fasciculus longitudinalis dorsalis
E	Cortex entorhinalis
EC	Capsula externa
FDC	Commissura fornicis dorsalis (Commissura hippocampi dorsalis)
FS	Fornix superior
GLD	Nucleus dorsalis corporis geniculati lateralis (thalami)
GLV	Nucleus ventralis corporis geniculati lateralis (thalami)
GM	Nucleus corporis geniculati medialis (thalami)
HI	Hippocampus
HIAV	Alveus hippocampi
HIS	Sulcus hippocampi
HMP	Nucleus mamillaris posterior (hypothalami)
HT	Tractus habenulo-interpeduncularis (Fasciculus retroflexus)
IG	Indusium griseum
IPF	Fossa interpeduncularis
LCF	Fissura longitudinalis cerebri
LM	Lemniscus medialis
MGT	Tractus mamillotegmentalis
MP	Pedunculus mamillaris
MT	Fasciculus mamillothalamicus
OPB	Nucleus tractus optici basalis
OPBT	Tractus opticus basalis
OPT	Tractus opticus
P	Area pretectalis
PC	Commissura posterior
PCP	Nucleus proprius commissurae posterioris
PFC	Cortex piriformis
RS	Sulcus rhinalis
S	Subiculum
SGP	Substantia grisea periventricularis
SNC	Substantia nigra, zona compacta
SNR	Substantia nigra, zona reticulata
TLP	Nucleus lateralis, pars posterior (thalami)
TP	Nucleus posterior (thalami)
TV	Nucleus ventralis (thalami)
TVA	Area tegmenti ventralis
VL	Ventriculus lateralis
VT	Ventriculus tertius
ZI	Zona incerta

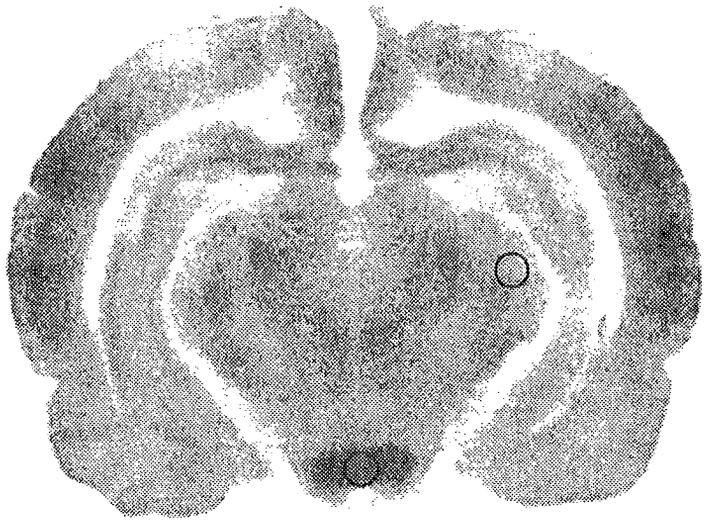
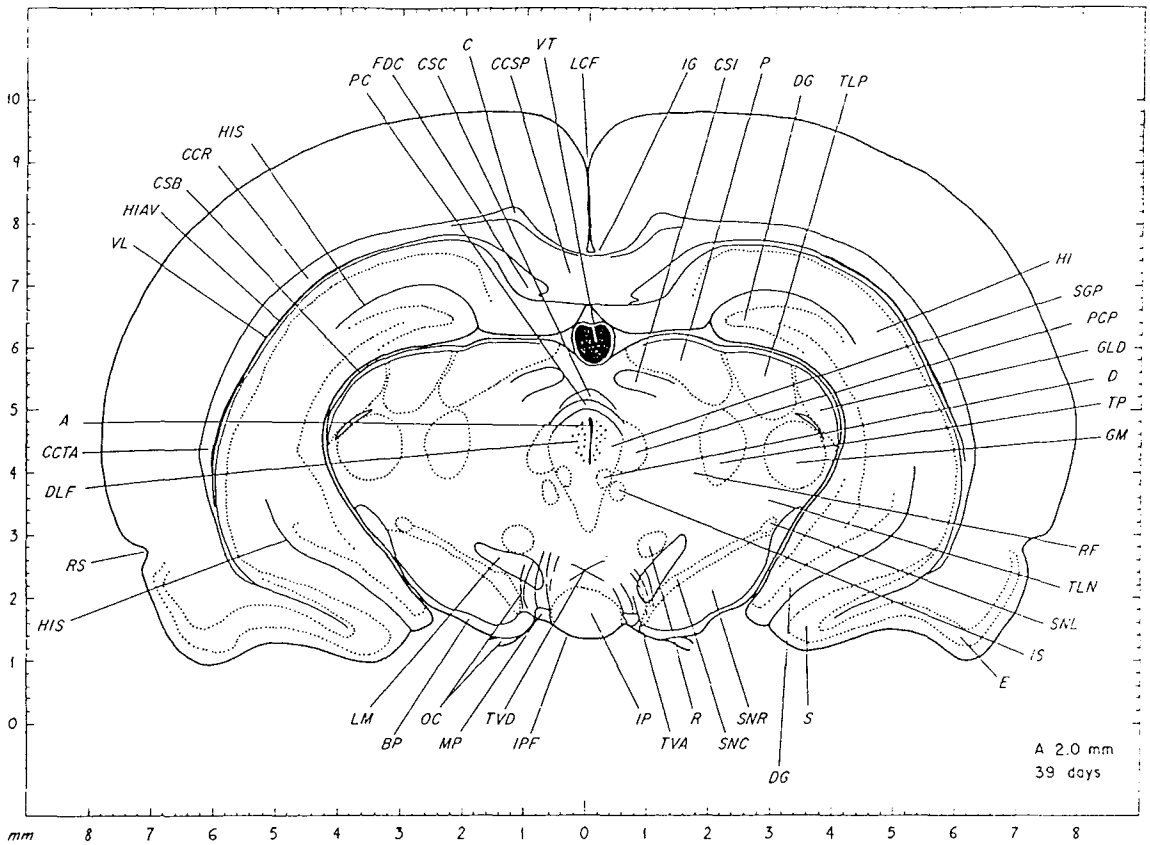


Figure VI : Localisation des corps mamillaires et du noyau genouillé latéral



A	Aqueductus cerebri
BP	Basis pedunculi
C	Cingulum
CCR	Radiatio corporis callosi
CCSP	Splenium corporis callosi
CCTA	Tapetum corporis callosi
CSB	Brachium colliculi superioris
CSC	Commissura colliculorum superiorum
CSI	Stratum album intermediale colliculi superioris
D	Nucleus Darkschewitsch
DG	Gyrus dentatus
DLF	Fasciculus longitudinalis dorsalis
E	Cortex entorhinalis
FDC	Commissura fornicis dorsalis (Commissura hippocampi dorsalis)
GLD	Nucleus dorsalis corporis geniculati lateralis (thalami)
GM	Nucleus corporis geniculati medialis (thalami)
HI	Hippocampus
HIAV	Alveus hippocampi
HIS	Sulcus hippocampi
IG	Indusium griseum
IP	Nucleus interpeduncularis
IPF	Fossa interpeduncularis
IS	Nucleus interstitialis (Cajal)
LCF	Fissura longitudinalis cerebri
LM	Lemniscus medialis
MP	Pedunculus mamillaris
OC	Nervus oculomotorius
P	Area pretectalis
PC	Commissura posterior
PCP	Nucleus proprius commissurae posterioris
R	Nucleus ruber
RF	Formatio reticularis
RS	Sulcus rhinalis
S	Subiculum
SGP	Substantia grisea periventricularis
SNC	Substantia nigra, zona compacta
SNL	Substantia nigra, pars lateralis
SNR	Substantia nigra, zona reticulata
TLN	Nucleus tegmenti lateralis
TLP	Nucleus lateralis, pars posterior (thalami)
TP	Nucleus posterior (thalami)
TVA	Area tegmenti ventralis
TVD	Decussatio tegmenti ventralis
VL	Ventriculus lateralis
VT	Ventriculus tertius

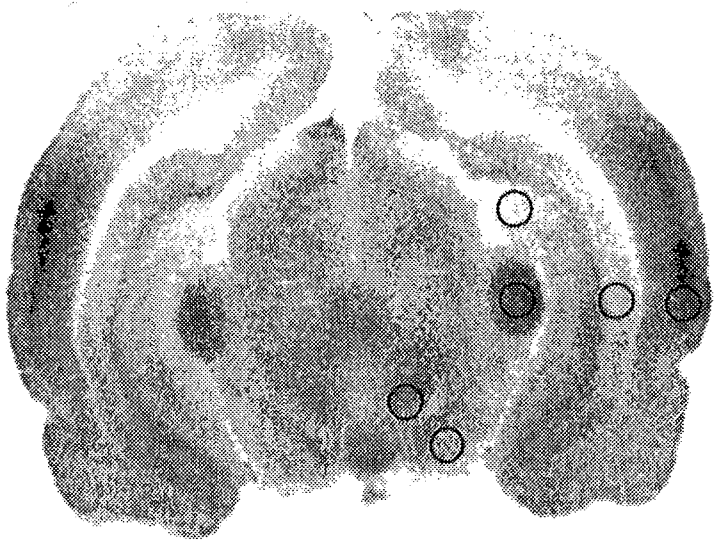
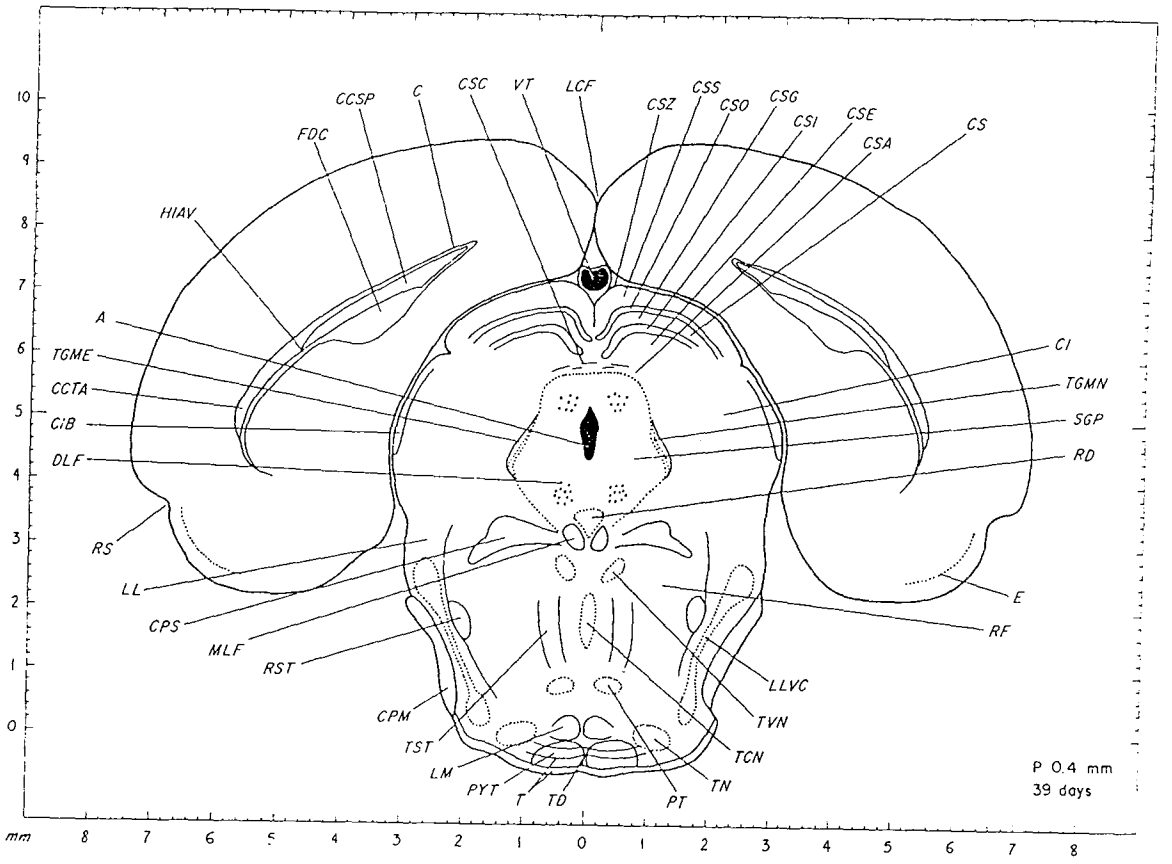


Figure VII : Localisation du noyau rouge, de la substance noire réticulée, du noyau genouillé médian, du gyrus denté, de l'hippocampe ventral et du cortex auditif



A	Aqueductus cerebri
C	Cingulum
CCSP	Splenium corporis callosi
CCTA	Tapetum corporis callosi
CI	Colliculus inferior
CIB	Brachium colliculi inferioris
CPM	Pedunculus cerebellaris medius (Brachium pontis)
CPS	Pedunculus cerebellaris superior (Brachium conjunctivum)
CS	Colliculus superior
CSA	Stratum album profundum colliculi superioris
CSC	Commissura colliculorum superiorum
CSE	Stratum griseum profundum colliculi superioris
CSG	Stratum griseum intermediale colliculi superioris
CSI	Stratum album intermediale colliculi superioris
CSO	Stratum opticum colliculi superioris
CSS	Stratum griseum superficiale colliculi superioris
CSZ	Stratum zonale colliculi superioris
DLF	Fasciculus longitudinalis dorsalis
E	Cortex entorhinalis
FDC	Commissura fornicis dorsalis (Commissura hippocampi dorsalis)
HIAV	Alveus hippocampi
LCF	Fissura longitudinalis cerebri
LL	Lemniscus lateralis
LLVC	Nucleus ventralis caudalis lemnisci lateralis
LM	Lemniscus medialis
MLF	Fasciculus longitudinalis medialis
PT	Nucleus tegmenti pontis
PYT	Fibrae corticospinales (pyramidalis)
RD	Nucleus dorsalis raphes
RF	Formatio reticularis
RS	Sulcus rhinalis
RST	Tractus rubrospinalis
SGP	Substantia grisea periventricularis
T	Corpus trapezoideum
TCN	Nucleus tegmenti centralis
TD	Decussatio corporis trapezoidei
TGME	Tractus mesencephalicus nervi trigemini
TGMN	Nucleus tractus mesencephalici nervi trigemini
TN	Nucleus corporis trapezoidei
TST	Tractus tectospinalis
TVN	Nucleus tegmenti ventralis
VT	Ventriculus tertius

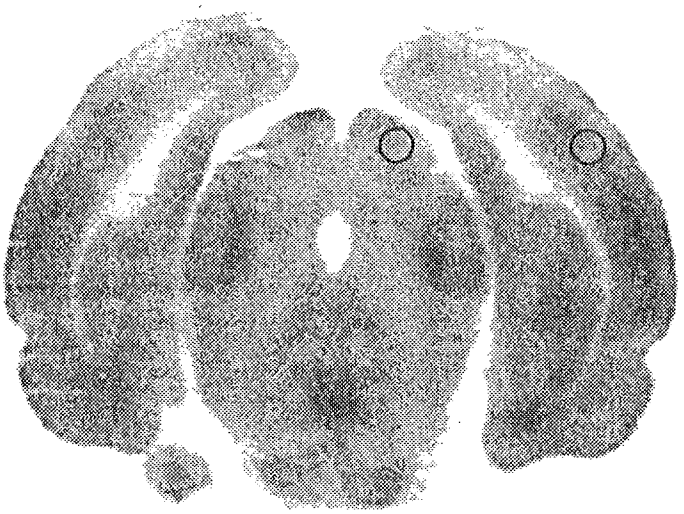
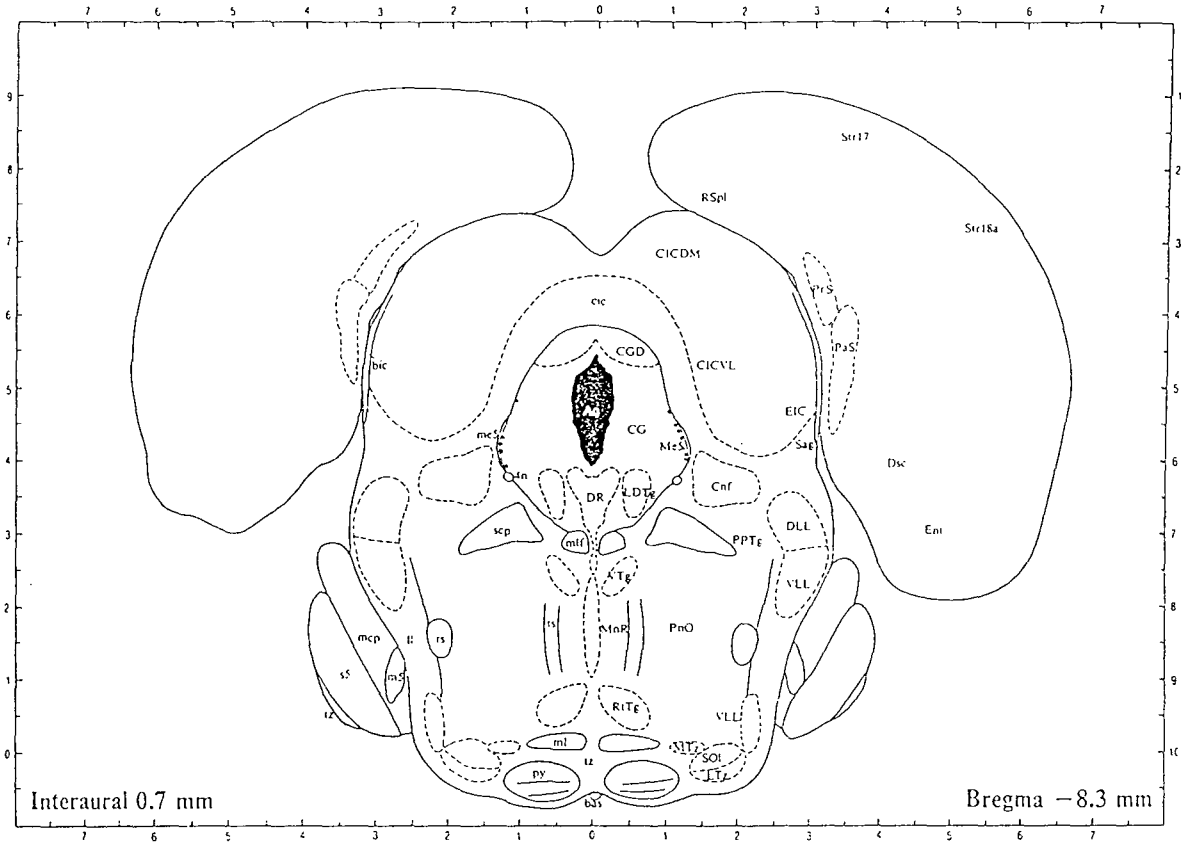
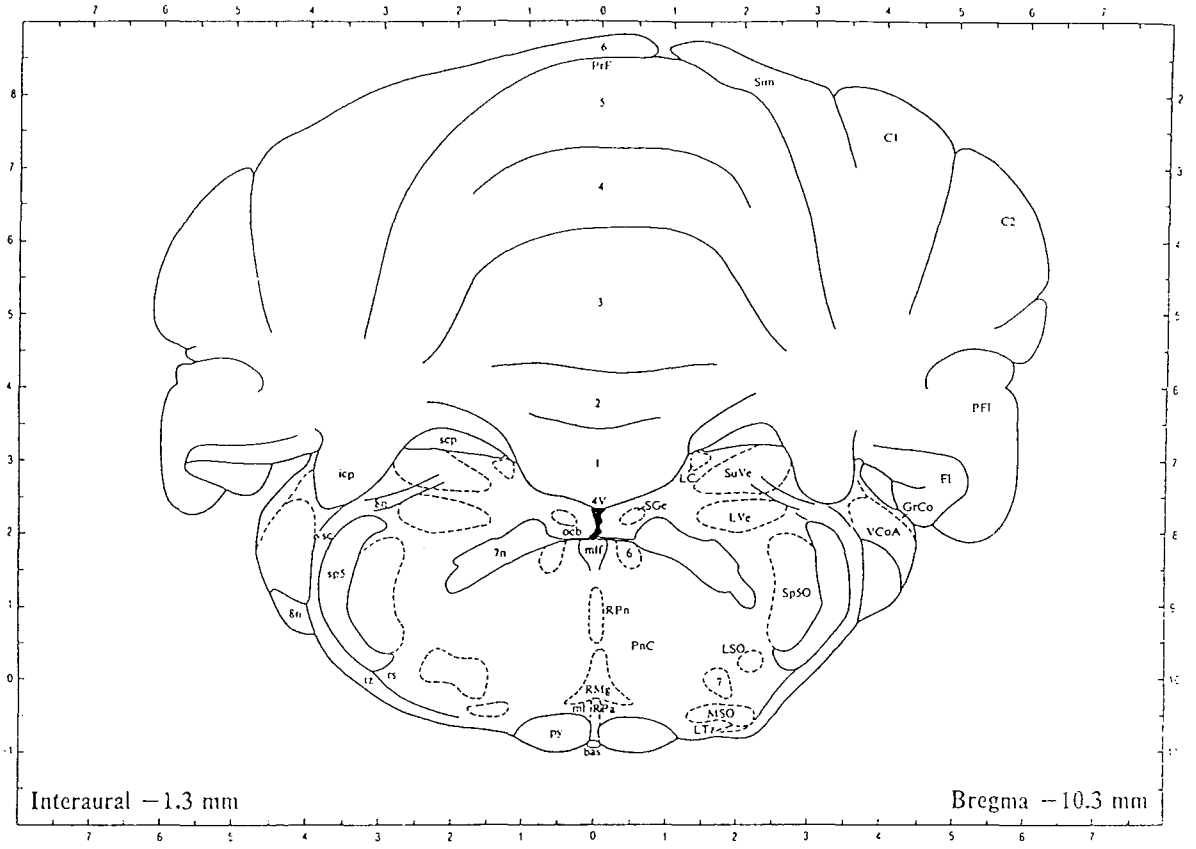


Figure VIII : Localisation du cortex visuel et de la collicule supérieure



4n trochlear nerve
Aq cerebral aqueduct
bas basilar artery
bic brachium inf colliculus
CG central grey
CGD central grey, dors
cic commissure inf colliculus
CICDM central nu inf colliculus, dorsomedial
CICVL central nu inf colliculus, ventrolateral
Cnf cuneiform nu
DLL dors nu lat lemniscus
DR dors raphe nu
Dsc lamina dissecans entorhinal cortex
EIC ext nu inf colliculus
Ent entorhinal cortex
LDTg laterodorsal tegmental nu
ll lat lemniscus
LTz lat nu trapezoid body
m5 motor root trigeminal nerve
mcp middle cerebellar peduncle
MeS nu mesencephalic tr trigeminal nerve
meS mesencephalic tr trigeminal nerve
ml med lemniscus
mlf med longitudinal fasciculus
MnR median raphe nu
MTz med nu trapezoid body
PaS parasubiculum
PnO pontine reticular nu, oral
PPTg pedunculopontine tegmental nu
PrS presubiculum
py pyramidal tr
rs rubrospinal tr
RSpl retrosplenial cortex
RtTg reticulotegmental nu pons
s5 sensory root trigeminal nerve
Sag sagulum nu
scp sup cerebellar peduncle
SOl sup olive
Str17 striate cortex, area 17
Str18a striate cortex, area 18a
ts tectospinal tr
tz trapezoid body
VLL vent nu lat lemniscus
VTg vent tegmental nu

Figure IX : Localisation de la collicule inférieure et du lemnisque latéral



4V fourth ventricle
6 abducens nu
7 facial nu
7n facial nerve
8n vestibulocochlear nerve
bas basilar artery
C1 crus 1 ansiform lobule
C2 crus 2 ansiform lobule
Fl flocculus
GrCo granule cell layer cochlear nuclei
icp inf cerebellar peduncle
LC locus coeruleus
LSO lat sup olive
LTz lat nu trapezoid body
LVe lat vestibular nu
ml med lemniscus
mlf med longitudinal fasciculus
MSO med sup olive
ocb olivocochlear bundle
PFl paraflocculus
PnC pontine reticular nu, caudal
PrF primary fissure
py pyramidal tr
RMg raphe magnus nu
RPa raphe pallidus nu
RPn raphe pontis nu
rs rubrospinal tr
scp sup cerebellar peduncle
SGe suprageniculate nu pons
Sim simple lobule
sp5 spinal tr trigeminal nerve
Sp5O nu spinal tr trigeminal nerve, oral
SuVe sup vestibular nu
tz trapezoid body
VCoA vent cochlear nu, ant
vsc vent spinocerebellar tr
The ten lobules of the cerebellum are indicated by the numerals 1–10.

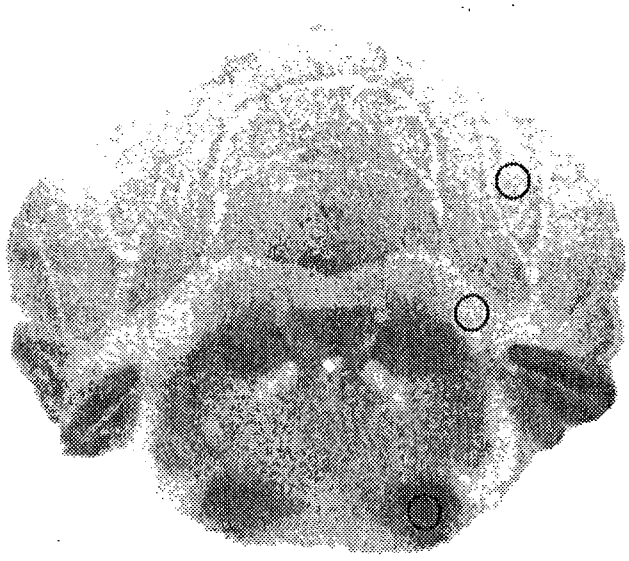
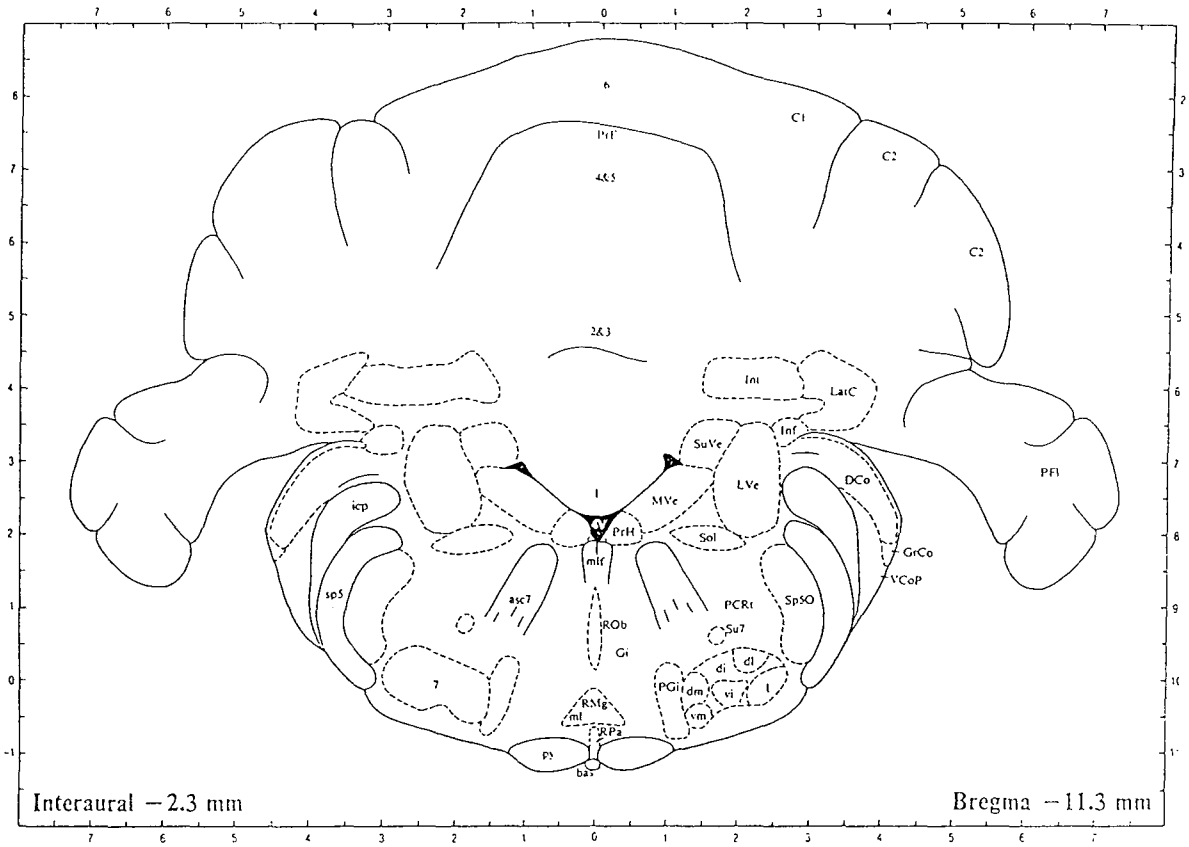


Figure X : Localisation de la matière blanche du cervelet, du cortex cérébelleux et de l'olive supérieure



4V fourth ventricle
7 facial nu
di = dors intermediate subnu
dl = dorsolateral subnu
dm = dorsomedial subnu
l = lat subnu
vi = vent intermediate subnu
vm = ventromedial subnu
asc7 ascending fibers facial nerve
bas basilar artery
C1 crus 1 ansiform lobule
C2 crus 2 ansiform lobule
DCo dors cochlear nu
Gi gigantocellular reticular nu
GrCo granule cell layer cochlear nuclei
icp inf cerebellar peduncle
Inf infracerebellar nu
Int interpositus cerebellar nu
LatC lat cervical nu
LVe lat vestibular nu
ml med lemniscus
mlf med longitudinal fasciculus
MVe med vestibular nu
PCRt parvocellular reticular nu
PFl paraflocculus
PGi paragigantocellular reticular nu
PrF primary fissure
PrH prepositus hypoglossal nu
py pyramidal tr
RMg raphe magnus nu
ROb raphe obscurus nu
RPa raphe pallidus nu
Sol nu solitary tr
sp5 spinal tr trigeminal nerve
SpSO nu spinal tr trigeminal nerve, oral
Su7 suprafacial nu
SuVe sup vestibular nu
VCoP vent cochlear nu, post
The ten lobules of the cerebellum are indicated by the numerals 1-10.

Figure XI : Localisation du noyau cochléaire et du noyau denté cérébelleux

CHAPITRE 3

Effets du phénobarbital sur des cultures pures de neurones de rat (mémoire G)

1. INTRODUCTION

1.1. Généralités

La complexité du système nerveux central (SNC) des mammifères sur le plan anatomique, physiologique et biochimique représente une barrière importante pour l'élucidation des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le développement cérébral. L'emploi des cultures de cellules permet par la simplification et le contrôle des variables expérimentales une approche de ces problèmes. Les cultures de cellules ou de tissus sont devenues, par les améliorations considérables des systèmes de culture, un outil important de la recherche dans le domaine des Neurosciences.

On peut considérer qu'il existe deux catégories de cultures de cellules : tout d'abord les cultures primaires dans lesquelles le tissu est prélevé d'un organisme et placé dans un milieu approprié. Celles-ci ont une durée de vie limitée. Puis les lignées de cellules continues qui prolifèrent et peuvent être "subcultivées" par passages répétés dans de nouveaux milieux de cultures.

1.2. Historique

On admet généralement que la culture de tissu nerveux a commencé avec les travaux de Harrison en 1907. Celui-ci a transplanté une section de tube neural d'embryon de grenouille dans une lamelle de verre creuse contenant un caillot de lymphe. Cette préparation a permis d'observer la croissance des fibres nerveuses à partir des corps cellulaires des neurones et la formation d'un réseau de fibres, confirmant ainsi la validité de la théorie neuronale.

Pendant une cinquantaine d'années, les cultures d'explants ont dominé la culture cellulaire dans le domaine des Neurosciences (Murray, 1965). Ces cultures permettent l'étude qualitative du développement, de la physiologie et de la cytopathologie des cellules nerveuses. Les lignées de neuroblastes et de glioblastes tumoraux présentent l'avantage

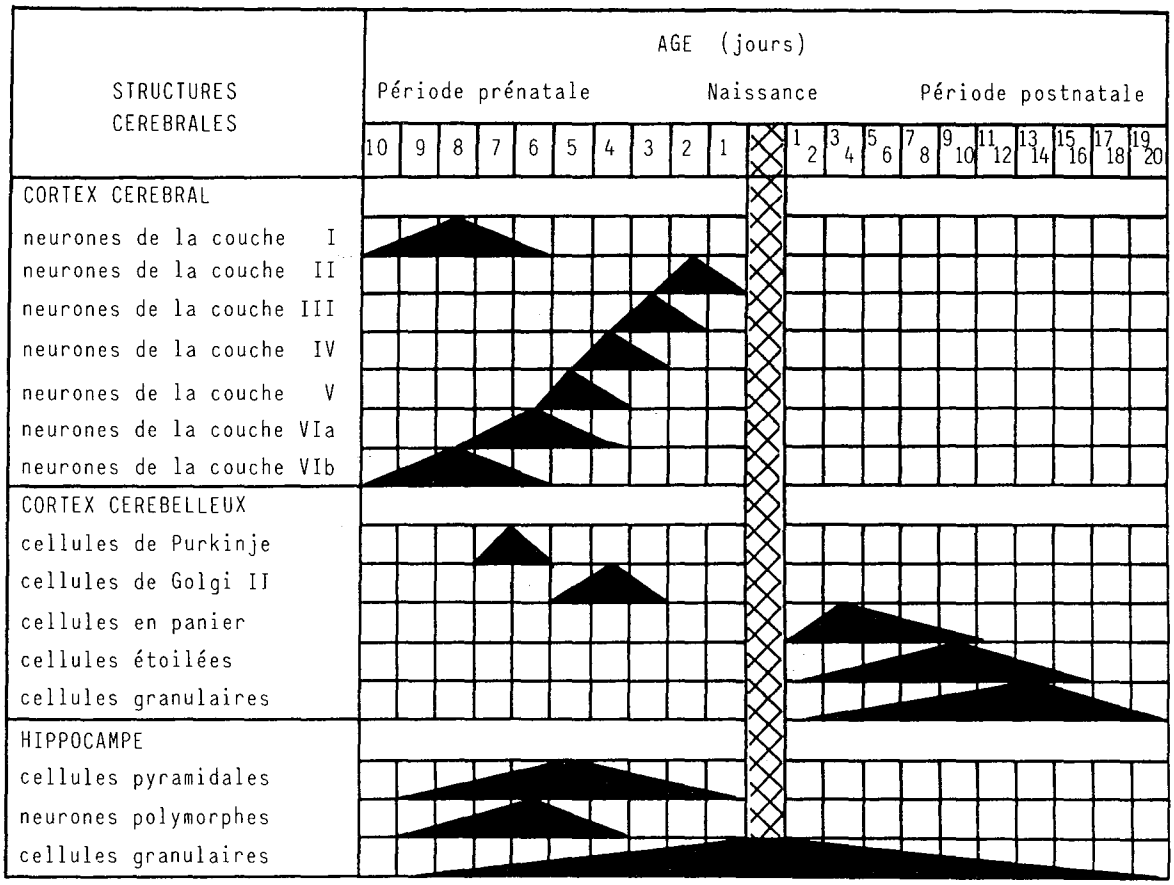


Figure 1 : Profil d'apparition des neurones (triangles noirs) dans le cerveau de rat (cortex cérébral et cervelet) et de souris (hippocampe). Il a été montré que le rat et la souris présentent un développement similaire (Butler et Juurlink, 1984) et sont comparables à la naissance (Hertz et coll., 1985).

de proliférer de manière importante et sont cultivées pendant de nombreuses générations. Le caractère néoplasique de ces cellules pose cependant la question de la normalité de leurs mécanismes de régulation. L'immortalité apparente de ces lignées cellulaires semble se faire au dépend d'altérations du génôme, corrélées à une perte ou une diminution quantitative de certaines fonctions différenciées des cellules (Hertz et Coll., 1985).

Les techniques de culture se sont alors orientées vers la culture primaire de cellules dissociées (Cavanaugh, 1955 ; Moscona, 1965 ; Nakai, 1956). Elles présentent l'avantage d'être des cellules normales diploïdes et reflètent plus étroitement le métabolisme et la fonction des cellules in vivo (Hertz et Chaban, 1982 ; Schousboe, 1977). En général, les cultures primaires de neurones ou d'astrocytes du SNC de mammifères sont obtenues à partir de tissu immature à un stade du développement favorisant le type cellulaire en question, c'est-à-dire cellules en prolifération et/ou cellules postmitotiques.

1.3. Ontogénèse de la formation des cellules neuronales : importance dans l'établissement de cultures monotypiques (Hertz et Coll., 1985 ; Jacobson, 1978)

Les cellules composant le tube neural sont des cellules neuroépithéliales pseudostratifiées. Ces cellules vont donner naissance à différentes populations cellulaires neuronales et macrogliales (astrocytes et oligodendrocytes) du SNC mature. En général, si on examine le développement d'une région spécifique du SNC on observe une séquence temporelle dans la production des cellules spécifiques (figure 1).

Chez le rat et la souris, la neurogénèse est presque terminée à la naissance à l'exception de la formation des interneurones des bulbes olfactifs, du gyrus denté et du cortex cérébelleux. La synaptogénèse commence pendant le développement foetal mais la période principale de

formation des synapses, le développement de l'arborisation dendritique et la maturation neuronale se produisent pendant les trois premières semaines de vie postnatale (Juraska et Fifkova, 1979).

La gliogénèse se situe principalement après la période principale de neurogénèse et la majorité des astrocytes est formée avant la période de formation des oligodendrocytes. Quelques cellules astrogliales apparaissent dès le 13e jour de gestation dans le néopallium chez le rat mais la majorité de ces cellules prolifèrent tard dans le développement foetal et dans les premières semaines après la naissance.

Les oligodendrocytes sont absents du cortex cérébral du rat nouveau-né. La période de formation et de maturation des oligodendrocytes se situe entre la 3e semaine et le 3e mois postnatal.

Booher et Sensenbrenner (1972) ont montré que des neurones postmitotiques obtenus à partir de SNC immature survivent mieux à la dissociation et à la mise en culture que des neurones de tissu nerveux plus mature. Si on considère la neurogénèse chez le rat, la période du développement la plus favorable permettant d'obtenir des cultures de neurones de cortex cérébral se situe entre le 15e et le 20e jour de gestation. D'autre part, la pureté des cultures de neurones est optimale lors de l'utilisation d'embryons âgés de 13 à 15 jours (Pettmann et Coll., 1979).

1.4. Cultures de neurones

Les techniques de cultures primaires de neurones font appel à la dissociation du tissu nerveux par des moyens mécaniques (agitation magnétique, pipette Pasteur) ou enzymatiques (trypsine, collogénase, pronase...) utilisés séparément ou en combinaison et permettant la culture de cellules nerveuses en couche monocellulaire. Ces méthodes ont permis l'étude de la différentiation morphologique (Booher et Sensenbrenner, 1972 ; Bornstein et Model, 1972 ; Varon et Raiborn, 1969) et biochimique des neurones et des cellules gliales en culture (Sensenbrenner et Coll., 1980 ; Werner et Coll., 1971).

L'obtention de cultures pures de neurones nécessite la mise en oeuvre de moyens permettant d'éliminer la croissance et le développement des cellules non neuronales qui tendent à envahir progressivement le milieu (astrocytes et fibroblastes). Pour cela, diverses stratégies ont été utilisées :

a) Les différences de densité entre les cellules permettent la séparation des types cellulaires par centrifugation sur gradient de saccharose ou de Ficoll (Henn, 1980 ; Varon, 1975 ; Varon et Raiborn, 1969).

b) L'emploi de drogues antimitotiques après la période de multiplication des neurones comme la cytosine arabinoside ou la fluorodésoxyuridine (analogues des bases pyrimidiques) a pour effet d'éliminer d'une culture mixte les cellules qui prolifèrent activement, en particulier les cellules gliales et les fibroblastes sans affecter les neurones qui sont postmitotiques (Dichter, 1978 ; Sotelo et Coll., 1980). Cependant, ces drogues peuvent s'incorporer en faible quantité dans l'ADN des neurones ou perturber la synthèse des ARN (en particulier la fluorodésoxyuridine) et sont susceptibles d'affecter les mécanismes de biosynthèse et de régulation des cellules.

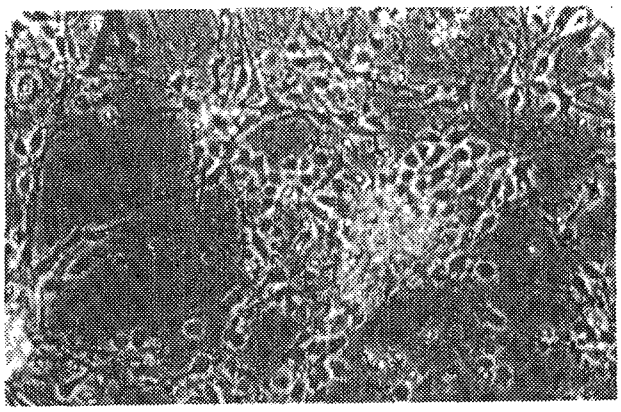
c) Un progrès important dans la mise au point de cultures pures de neurones a été la découverte de supports permettant la croissance préférentielle des neurones. L'adhésion des neurones embryonnaires est beaucoup plus rapide et plus forte sur des supports basiques présentant des charges positives comme le collagène ou la polylysine (Letourneau, 1975 ; Yavin et Yavin, 1974). La polylysine favorise ainsi la survie des neurones et le développement des fibres nerveuses mais affecte également la croissance des cellules non neuronales qui est ralentie ou totalement inhibée (Banker et Cowan, 1977 ; Pettman et Coll., 1979 ; Sensenbrenner et Coll., 1978 ; Yavin et Yavin, 1980).

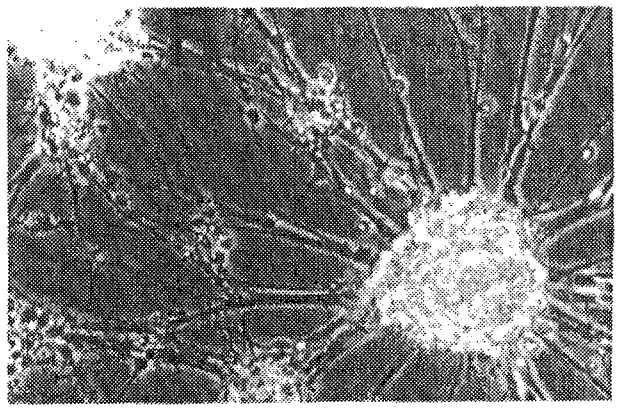
d) La meilleure connaissance des besoins nutritionnels des cellules a permis la mise au point de milieux de composition chimique définie pour la croissance de cellules nerveuses en absence de sérum. En effet, l'addition de liquides biologiques dans les milieux de cultures, bien qu'augmentant la capacité de survie des cellules, introduit inévitablement des variations liées à la composition non définie et

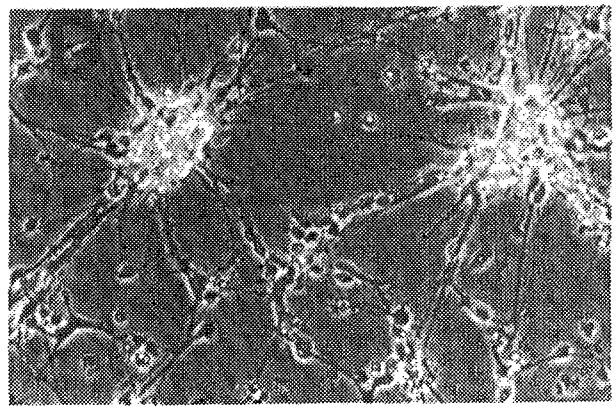
variable de ces liquides (Waymouth, 1977). Les milieux chimiquement définis permettent la croissance sélective des neurones alors que les cellules gliales survivent mal sans apport de sérum (Bottenstein, 1985 ; Bottenstein et Coll., 1980 ; Yavin et Yavin, 1980).

2. CULTURES PURES DE NEURONES D'EMBRYONS DE RAT

Les cultures de neurones sont obtenues à partir d'embryons de rat de 14 jours par une modification de la méthode précédement décrite pour la culture de neurones d'embryons de poulet (Pettman et Coll., 1979). Les hémisphères cérébraux sont disséqués (les méninges sont éliminées) et dispersés avec précaution dans un milieu chimiquement défini (DMEM/Ham'sF12) supplémenté avec 5 % de sérum de veau foetal inactivé, de la penicilline et de la streptomycine. La concentration finale en cellules est ajustée à 10^6 cellules par ml de milieu : en effet, la survie des neurones en culture ainsi que la croissance des neurites dépendent de la densité cellulaire (Banker et Cowan, 1977 ; Bornstein et Model, 1972). Les cellules sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO_2 et 95 % d'air. Après 3 jours de culture, le milieu est éliminé et remplacé par un milieu chimiquement défini sans sérum et supplémenté avec un certain nombre de facteurs nécessaires à la croissance des cellules in vitro. En effet, plusieurs études ont montré la nécessité de la présence de certaines substances dans un milieu de culture sans sérum (Ahmed et Coll., 1983 ; Bottenstein, 1985 ; Bottenstein et Sato, 1979). La transférine est une ß1 globuline qui permet le transport du fer : la plupart des cellules de mammifères ont des récepteurs de la transférine dont la densité est élevée pendant le stade de prolifération. L'insuline est un facteur de croissance au cours du développement foetal, la putrescine est une diamine, précurseur de la spermine et de la spermidine présentes en quantité importante dans les cellules en prolifération. De plus, la putrescine est un précurseur du GABA. La progestérone est indispensable aux neurones embryonnaires : en effet, il existe des récepteurs cytoplasmiques à haute affinité de la







A : Cultures de neurones témoins de 6 jours

B : Cultures de neurones témoins de 9 jours

D : Cultures de neurones de 9 jours exposées pendant 3 jours au PhB (5.10^{-4}M)

Figure 2 : Effets du PhB sur la croissance de neurones de cerveau d'embryons de rat en culture dans un milieu chimiquement défini.
Contraste de phase, grossissement x 230.

progestérone dans de nombreuses régions du cerveau et leur nombre est plus grand au début du développement. Enfin, le sélénium est un cofacteur de la glutathion péroxidase qui protège les membranes cellulaires des dommages causés par la péroxidation des lipides.

Dans notre étude, le traitement pharmacologique a été réalisé soit entre le 3e et le 6e jour (période de prolifération cellulaire) soit entre le 6e et le 9e jour de culture (période de maturation cellulaire) (Borg et Coll., 1985) par addition de PhB à une concentration de 5.10^{-4}M dans le milieu de culture. La dose de médicament utilisée est proche de celle atteinte en clinique dans le cerveau des patients. En effet, le PhB a une action thérapeutique lorsque les taux circulants de médicament atteignent 40 à 160 uM soit 25 à 100 uM de PhB libre. Le taux de médicament libre est le reflet des concentrations dans l'espace extracellulaire cérébral (Macdonald, 1984).

3. EFFETS DU PHENOBARBITAL SUR LA CROISSANCE DES NEURONES EN CULTURES

Comme le montre la figure 2A, les cultures témoins de 6 jours présentent de nombreuses cellules neuronales en survie avec très peu d'éléments non neuronaux. Les corps cellulaires ont une forme polygonale et sont interconnectés par un réseau dense de fibres. Au 9e jour de culture, la taille des corps cellulaires est plus importante, les cellules forment des aggrégats et présentent une arborisation neuronale abondante (figure 2B).

Une exposition au PhB à partir du 3e jour de culture induit une réduction de la prolifération des cellules mise en évidence par une diminution de la croissance des fibres nerveuses dans les cultures de neurones de 6 jours. Cependant, la plupart des neurones sont capables de survivre. A 9 jours, soit 3 jours après l'arrêt du traitement, les cultures traitées au PhB présentent un nombre important de cellules isolées ou formant de petits aggrégats alors que les cultures témoins

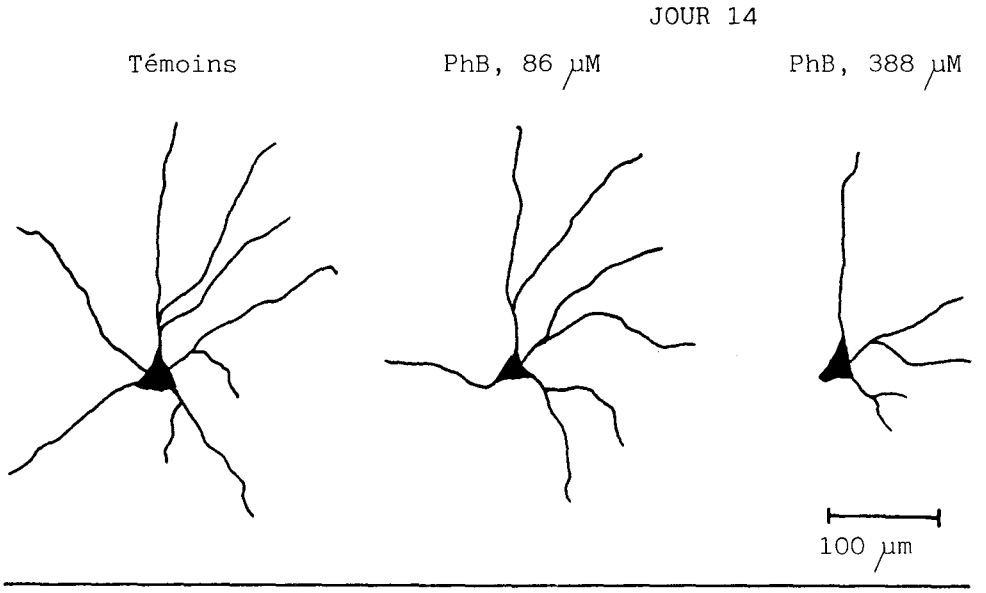


Figure 3 : Effets du phénobarbital sur l'arborisation dendritique des neurones en culture traités à partir du 14e jour et pendant 4 semaines (Serrano et Coll., 1988).

présentent de nombreux aggrégats cellulaires de taille importante. Lorsque le PhB est ajouté dans le milieu de culture à partir du 6e jour, on observe également des altérations de la densité des neurites accompagnées d'une réduction du nombre des cellules (figure 2D).

Ces résultats montrent qu'un traitement au PhB (5.10^{-4}M) pendant 3 jours affecte le nombre et la morphologie des neurones en culture et sont en accord avec ceux obtenus par Bergey et Coll. (1981) et Serrano et Coll. (1988) sur des cultures de neurones de moelle épinière d'embryons de souris. Ces auteurs ont montré qu'un traitement prolongé de 2 à 6 semaines au PhB induit une diminution dose-dépendante du nombre des neurones. De même, Neale et Coll. (1985) ont étudié la toxicité de différents médicaments antiépileptiques sur des cultures de cellules de cortex cérébral d'embryons de souris et ont observé une diminution significative de 44 % du nombre des neurones en culture après une exposition au PhB pendant 11 jours.

Le PhB induit également une réduction significative des prolongements cellulaires conduisant à une inversion de la fréquence des neurones multipolaires et bipolaires par rapport aux cultures témoins qui présentent un fort pourcentage de neurones multipolaires (Dow et Riopelle, 1988 ; Serrano et Coll., 1988 ; figure 3).

De plus, les effets du PhB sur la survie et les caractéristiques morphologiques des neurones en culture sont plus marqués si l'exposition au PhB est plus tardive, c'est-à-dire à partir du 14e jour de culture comparativement à une exposition à partir du 2e jour de culture (Serrano et Coll., 1988).

Par contre, les effets du PhB sur des cultures mixtes de neurones et de cellules gliales diffèrent de ceux obtenus sur des cultures pures de neurones. Culver et Vernadakis (1979) montrent que le PhB à des concentrations variant de 10^{-4} à 10^{-3}M pendant 3 jours n'affecte ni le nombre des cellules en culture ni les processus neuronaux dans des cultures mixtes de neurones et de cellules gliales d'embryons de poulet en culture dans un milieu supplémenté avec du sérum à 20 %. Ce modèle de

culture différent de ceux présentés ci-dessus pourrait permettre d'expliquer ces résultats : en effet, la toxicité du PhB pourrait être plus importante sur les neurones que sur les cellules gliales comme Yanagihara et Hamberger (1971) ainsi que Culver et Vernadakis (1979) l'ont suggéré pour la diphénylhydantoine. La proportion importante de cellules gliales pourrait atténuer ou masquer les effets du PhB sur les neurones en culture. De plus, la concentration importante de sérum présente dans le milieu de culture pourrait protéger les cellules des effets du médicament par liaison du PhB aux protéines sériques et en particulier à l'albumine (Maynert, 1982). En effet, Dow et Riopelle (1988) ont montré que plus de 80 % du PhB est lié aux protéines dans un milieu contenant 5 % de sérum de veau foetal.

La question qui se pose est de savoir s'il est possible d'établir des corrélations entre les études in vitro et in vivo des effets du PhB sur le développement cérébral. En effet, chez le rat ou la souris une exposition précoce au PhB induit un retard significatif de croissance corporelle et cérébrale (Diaz et Schain, 1978 ; Diaz et Coll., 1977 ; Schain et Watanabe , 1975 ; Mémoires A et C). La diminution du poids du cerveau observée chez les animaux traités précocement au PhB s'accompagne d'une réduction du nombre des cellules, en particulier au niveau du cervelet et de l'hippocampe (Hannah et Coll., 1982, 1988 ; Yanai, 1984 ; Yanai et Bergman , 1981 ; Yanai et Coll., 1979). Les déficits du nombre des cellules cérébrales sont plus importants lorsque l'exposition est néonatale que lors d'un traitement prénatal. Ces travaux montrent que le PhB peut détruire non seulement des cellules en prolifération, migration et différentiation mais aussi des neurones déjà formés (Yanai, 1984).

De plus, les déficits du nombre des cellules au niveau du cervelet et de l'hippocampe s'accompagnent d'anomalies sévères de l'arborisation dendritique des cellules. Jacobson et Coll. (1988) ont mis en évidence une réduction importante de la longueur des segments et du nombre des pointes dendritiques au niveau des neurones de la région CA1 de l'hippocampe de rat après une exposition au PhB du 18e au 21e jour de

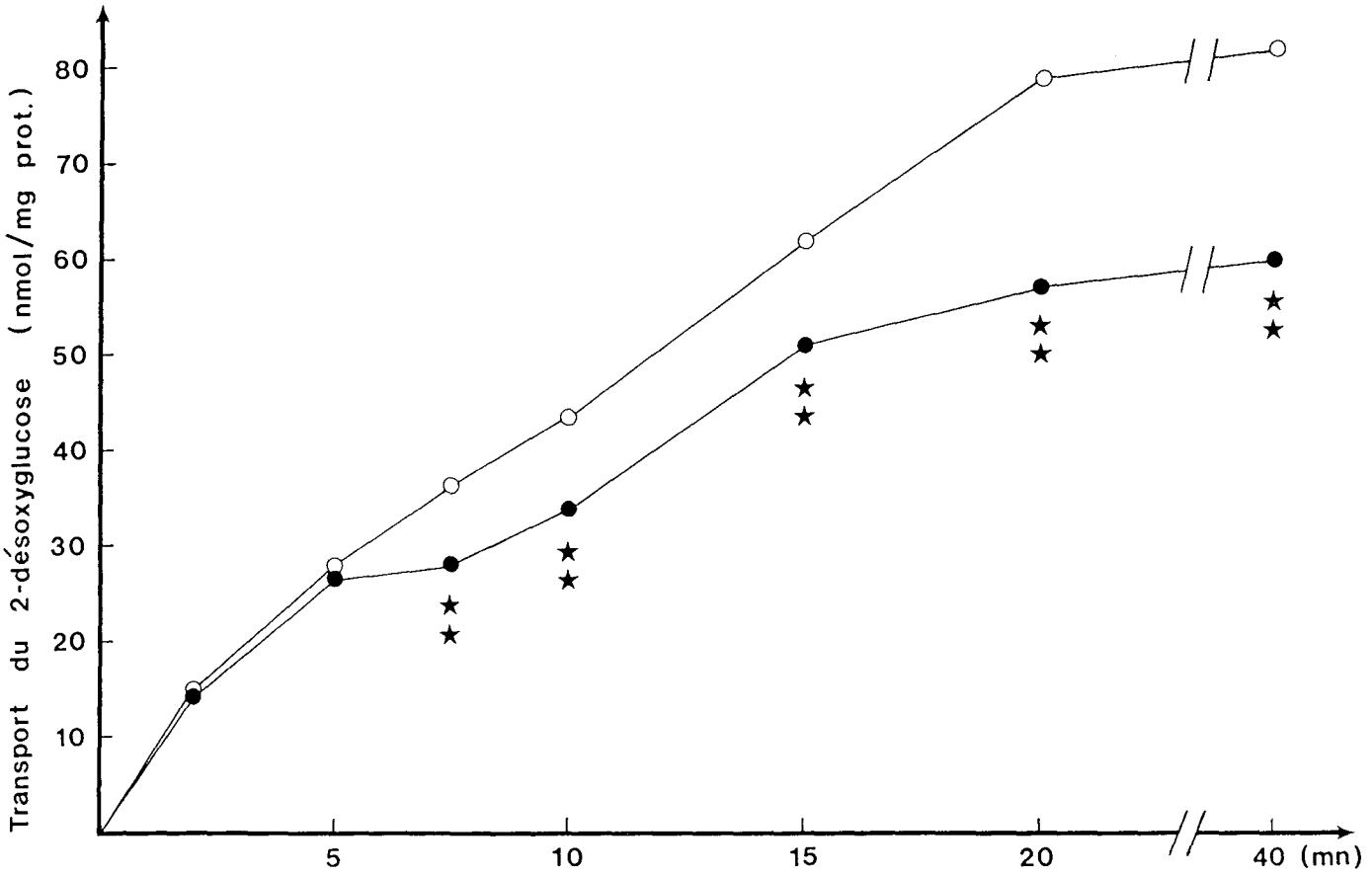


Figure 4 : Effets du PhB sur le transport spécifique du 2DG-(^{3}H) dans des cultures de neurones de 6 jours.
Chaque point représente la moyenne de 3 à 5 cultures. La D.S. maximale est de ± 12 %.
* * $p < 0,01$, différence statistiquement significative par rapport aux témoins (test t de Student).
○——○ : témoins ●——● : PhB

la gestation. De même, Hannah et Coll. (1988) et Yanai et Iser (1981) ont observé des anomalies morphologiques de l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje du cervelet après une exposition précoce au PhB.

En conclusion de ces études concernant la neurotoxicité du PhB, il existe une bonne corrélation entre les études réalisées in vivo et in vitro. Le PhB affecte le nombre et la croissance des neurones de manière plus importante lorsque ceux ci sont plus matures, c'est-à-dire lorsque l'exposition est plus tardive (Serrano et Coll., 1988 ; Yanai, 1984). Ces résultats suggèrent que les neurones moins différenciés sont moins sensibles et/ou sont capables de s'adapter aux effets du médicament.

4. EFFETS DU PHENOBARBITAL SUR LE TRANSPORT DU GLUCOSE

Le transport du glucose dans les neurones en culture a été étudié en mesurant le prélèvement spécifique du 2-désoxyglucose-(^{3}H) (2DG-(^{3}H)), un analogue du glucose qui utilise le même système de transport que le glucose mais s'accumule dans les cellules. Quelle que soit la période de traitement (3e au 6e jour ou 6e au 9e jour), le PhB induit une diminution significative de 14 à 29 % du transport spécifique du 2DG-(^{3}H) dans les neurones en culture par rapport aux cellules témoins (figures 4 et 5). Une exposition au PhB pendant la phase de maturation cellulaire (6e au 9e jour) induit une inhibition du transport du 2DG-(^{3}H) dès la 2e mn d'incubation alors qu'une exposition plus précoce (3e au 6e jour) affecte le transport du glucose uniquement pour des temps d'incubation supérieurs à 5 mn. Trois jours après l'élimination du médicament le transport du glucose dans les neurones en culture reste significativement affecté par le PhB mais de manière moins importante qu'après 3 jours de traitement. En effet, le transport spécifique du 2DG-(^{3}H) dans les cultures traitées au PhB est significativement diminué de 12 à 16 % par rapport aux cultures témoins pour des temps d'incubation supérieurs à 7,5 mn (figure 6).

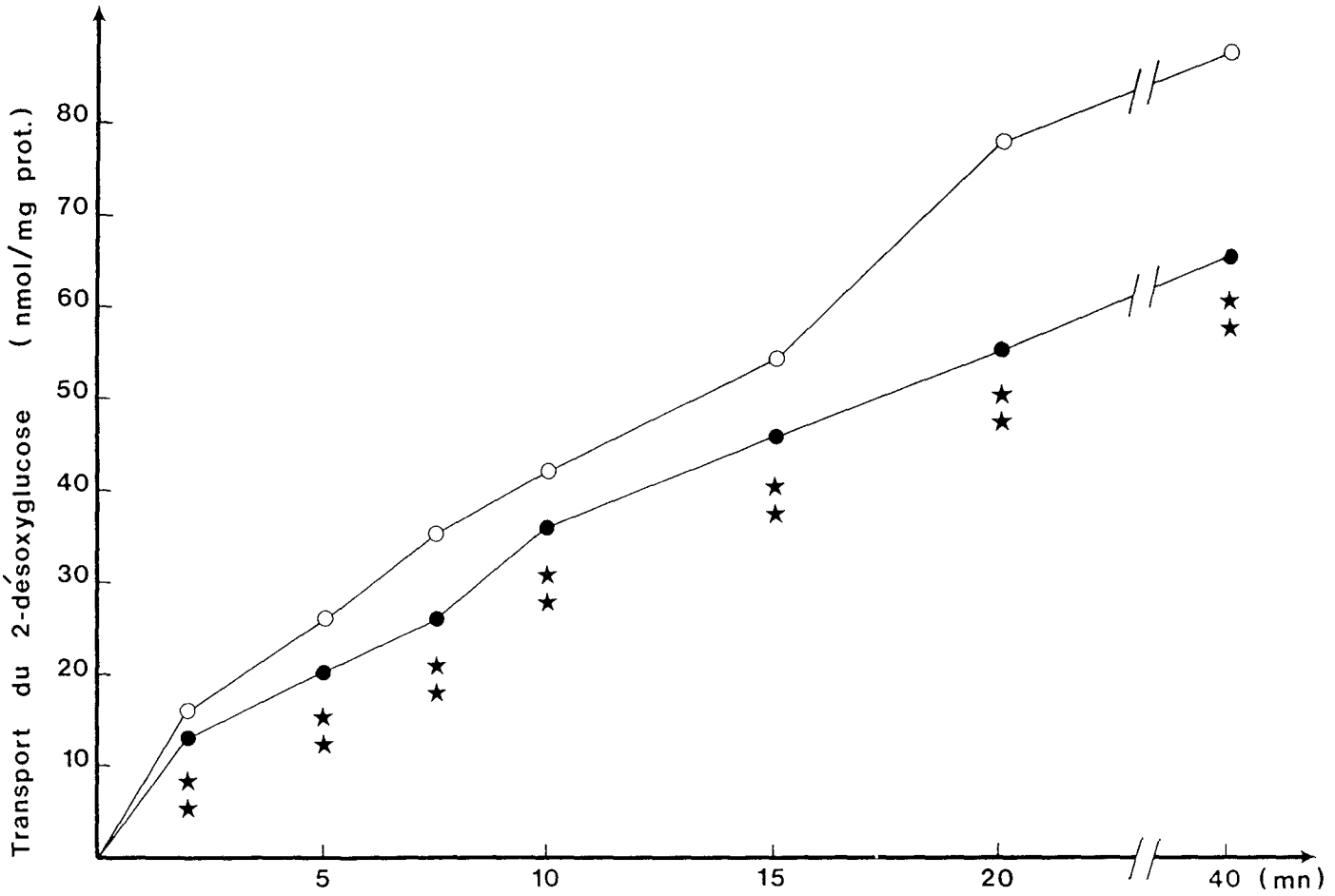


Figure 5 : Effets du PhB sur le transport spécifique du 2DG-(^{3}H) dans des cultures de neurones de 9 jours.
Chaque point représente la moyenne de 3 à 4 cultures. La D.S. maximale est ± 14,5 %.
* * $p < 0,01$, différence statistiquement significative par rapport aux témoins (test t de Student).
○——○ : témoins ●——● : PhB

Ces résultats montrent que le PhB affecte l'utilisation de glucose dans les neurones : la diminution du prélèvement du 2DG-(^{3}H) est certainement le reflet d'une baisse du métabolisme dans ces cellules. L'étude des effets du PhB, 3 jours après l'arrêt du traitement, montre que les déficits dans le transport du glucose persistent, bien que l'on observe une récupération partielle du taux de prélèvement de 2DG-(^{3}H) dans les neurones en culture traités au PhB.

Ces résultats sont en accord avec des études réalisées in vivo concernant l'influence d'un traitement chronique précoce au PhB sur l'utilisation du glucose comme substrat de la biosynthèse des acides aminés cérébraux chez le rat entre 7 et 35 jours de vie postnatale (chap. 1 ; Mémoires A et C). En effet, le PhB induit une diminution de la conversion du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux au cours du développement postnatal du rat. D'autre part, la mesure de l'utilisation cérébrale locale de glucose chez le rat entre 10 jours et l'âge adulte met en évidence chez les rats traités au PhB, une diminution à court terme de l'utilisation de glucose dans l'ensemble des structures cérébrales étudiées par rapport aux témoins. La dépression des taux d'UCLG persiste à long terme dans un certain nombre de territoires chez l'animal adulte traité au PhB en période postnatale (chap. 2 ; Mémoires D, E et F).

Il a également été montré in vivo que les barbituriques à doses anesthésiantes induisent une augmentation des concentrations cérébrales de glucose ainsi que du rapport du glucose tissulaire sur le glucose plasmatique. De plus, les teneurs cérébrales en glycogène et glucose-6P sont augmentées et les concentrations en fructose-1,6diP sont diminuées, mettant en évidence une inhibition au niveau de la phosphofructokinase (Chapman et Coll., 1978 ; Gatfield et Coll., 1966 ; Mayman et Coll., 1964 ; Nilsson et Siesjö, 1974 ; Strang et Bachelard, 1973). L'augmentation des concentrations de glucose dans le cerveau ainsi que

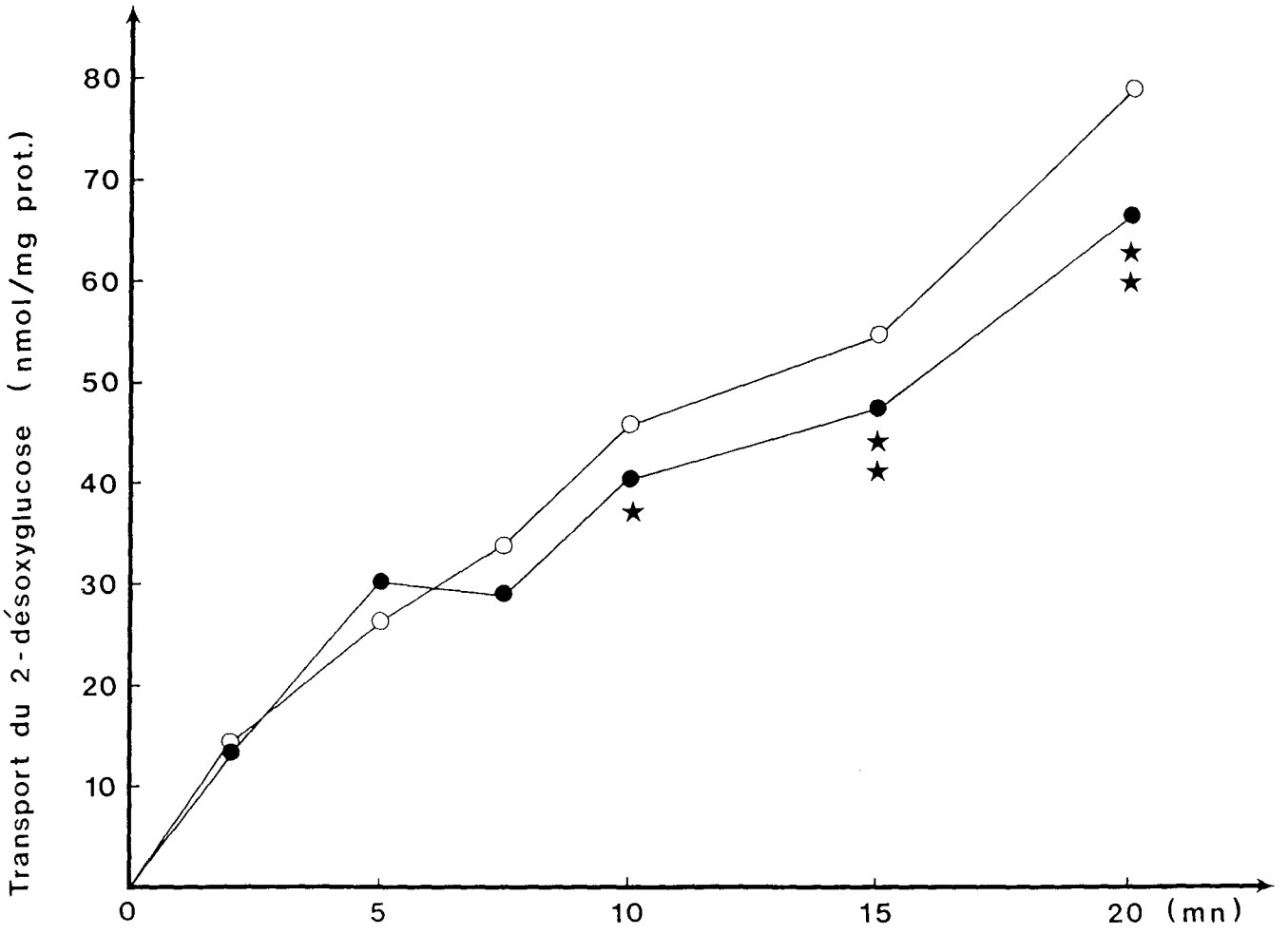


Figure 6 : Effets du PhB sur le transport spécifique du 2DG-(^{3}H) dans des cultures de neurones de 9 jours, 3 jours après l'élimination du médicament.
Chaque point représente la moyenne de 3 à 5 cultures. La D.S. maximale est $\pm$ 11 %.
* $p < 0,05$, * * $p < 0,01$, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins (test t de Student).
○——○ : témoins ●——● : PhB

l'augmentation du rapport des concentrations du glucose tissulaire sur le glucose plasmatique peuvent être attribuées à plusieurs facteurs qui sont :

1)l'hypothermie,

2)la diminution du métabolisme cérébral,

3)l'altération des mécanismes de transport du glucose.

Certains auteurs ont suggéré que l'augmentation des concentrations cérébrales de glucose pourrait être la conséquence de modifications du transport du glucose (Gatfield et Coll., 1966 ; Mayman et Coll., 1964 ; Strang et Bachelard, 1973). De plus, Phillips et Coxon (1976) mettent en évidence une augmentation significative de 61 % du transport spécifique du 2DG-(^{14}C) dans des coupes de cerveaux de rats anesthésiés au PhB. Cependant, il semble que la diminution de la consommation d'oxygène et de glucose induite par les anesthésiques peut par elle-même provoquer une augmentation du taux de glucose dans le cerveau (Siesjö, 1978). En effet, plusieurs études montrent que l'augmentation des concentrations tissulaires de glucose observée pendant l'anesthésie au pentobarbital ou à l'aide de gaz volatiles peut s'expliquer par la simple diminution du métabolisme (Brunner et Coll., 1971 ; Nilsson et Siesjö, 1974).

Des travaux plus récents ont mis en évidence des perturbations du transport du glucose du sang au cerveau au cours de l'anesthésie au pentobarbital (Gjedde et Rasmussen, 1980). Ces auteurs ont montré une diminution de la capacité maximale de transport, Tmax, et de la constante d'affinité, Km. La diminution du transport du glucose est équivalente à la dépression du débit sanguin cérébral et de la glycolyse. Il semble donc que le cerveau même en présence de barbituriques soit capable de maintenir un rapport constant entre le flux au travers de la barrière hémato-encéphalique et le taux d'utilisation de glucose (Pardridge, 1983 ; Pardridge et Coll., 1982).

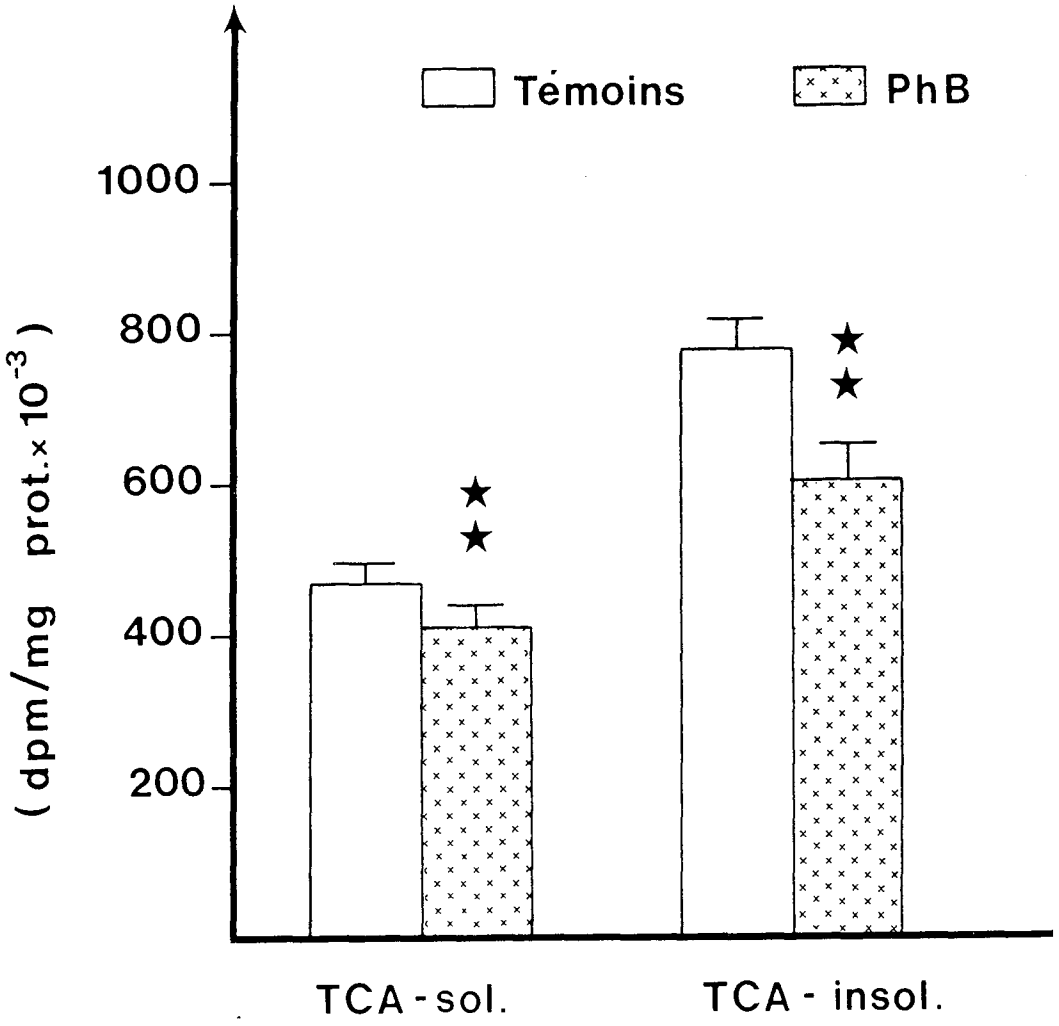


Figure 7 : Effets du PhB sur l'incorporation de la leucine-(^{14}C) dans les protéines des neurones en culture, dans la fraction acido-soluble et acido-insoluble.
Les valeurs représentent des moyennes ± D.S. de 3 à 4 cultures.
** $p < 0,01$, différence statistiquement significative par rapport aux témoins (test t de Student).
Abréviation : TCA : acide trichloracétique.

5. EFFETS DU PHENOBARBITAL SUR LA SYNTHESE PROTEIQUE

L'inhibition du prélèvement de 2DG-(^{3}H) par les neurones en culture traités au PhB est toujours associée à une diminution significative de l'ordre de 20 % du taux de protéines par boîte de Pétri par rapport aux cultures témoins. Cette baisse du contenu en protéines peut être le reflet d'une réduction du nombre des cellules et/ou d'une pertubation de la synthèse protéique. Nous avons donc étudié les effets du PhB sur la synthèse des ARN et des protéines. L'incorporation de L-leucine-(^{14}C) et d'uridine-(^{14}C) est réalisée sur des cultures de 6 jours. La radioactivité de la fraction acido-soluble et de la fraction acido-insoluble est mesurée après 24 h d'incubation en présence de leucine-(^{14}C) et après 48 h d'incubation en présence d'uridine-(^{14}C).

La figure 7 montre que le PhB affecte significativement le prélèvement total de leucine-(^{14}C) par les neurones, c'est-à-dire l'incorporation de la leucine dans la fraction acido-soluble. De plus, le PhB induit une diminution de l'accumulation de leucine radioactive dans la fraction acido-insoluble. Ces résultats mettent en évidence une diminution significative de 22 % de la synthèse protéique dans les neurones traités au PhB par rapport aux cellules témoins. En ce qui concerne la biosynthèse des ARN, le PhB n'affecte pas l'accumulation d'uridine-(^{14}C) dans la fraction acido-soluble mais diminue significativement de 11 % l'incorporation d'uridine-(^{14}C) dans la fraction acido-insoluble (figure 8).

Neale et Coll. (1985) ont également montré que le PhB affecte le taux de protéines dans des cultures de cellules de cortex cérébral d'embryons de souris. Ces auteurs observent une diminution de 20 % du taux de protéines par boîte après une exposition de 11 jours au PhB à la dose de $2,5.10^{-4}$M. Par contre, Bergey et Coll. (1979) montrent qu'une exposition au PhB pendant 2 semaines n'affecte pas le taux de protéines bien que le nombre des neurones soit fortement diminué dans les cultures traitées au PhB. Une explication possible est la présence de cellules non neuronales qui pourraient ne pas être affectées par le traitement et

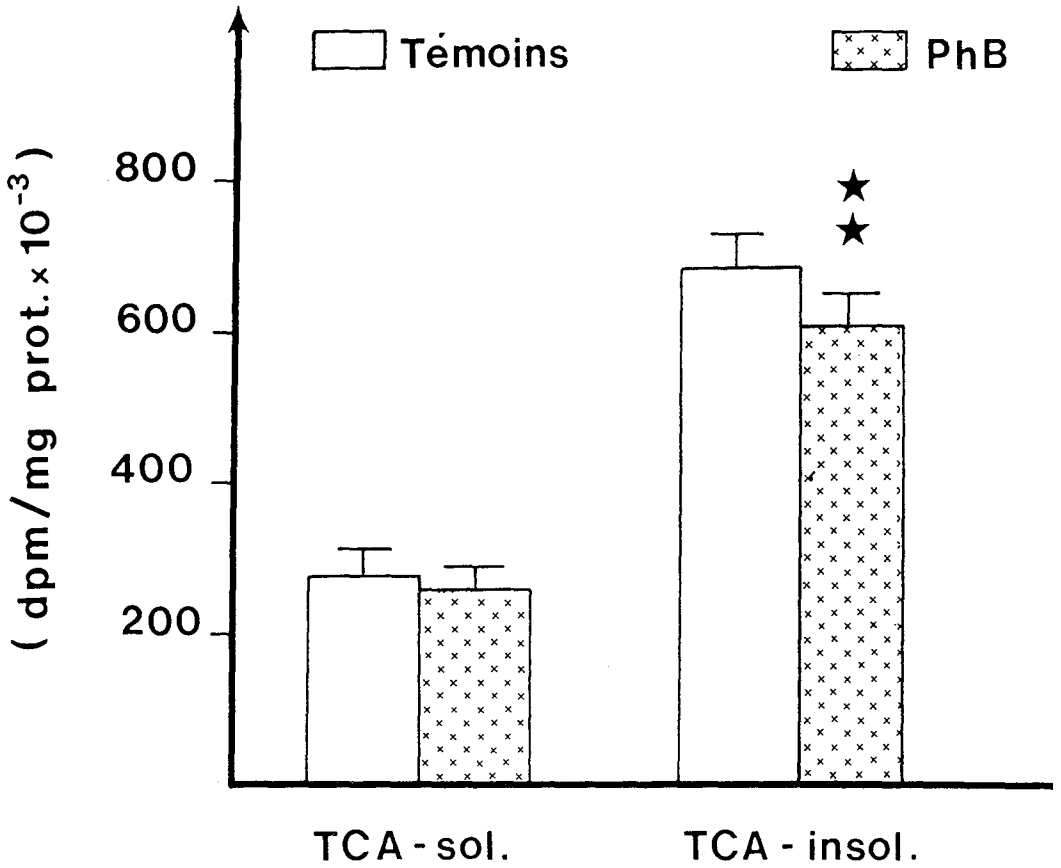


Figure 8 : Effets du PhB sur l'incorporation d'uridine-(^{14}C) dans les ARN des neurones en culture, dans les fractions acido-soluble et acido-insoluble.
Les valeurs représentent des moyennes ± D.S. de 3 à 4 cultures.
* * $p < 0,01$, différence statistiquement significative par rapport aux témoins (test t de Student).
Abréviation : TCA : acide trichloracétique.

masquer l'effet du médicament sur les neurones en culture. De même, une exposition pendant 3 jours à des doses élevées de PhB (10^{-3} à 10^{-4}M) n'affecte pas l'incorporation de leucine-(^{14}C) dans les protéines des neurones et des cellules gliales en culture mixte (Culver et Vernadakis, 1979). Comme nous l'avons discuté dans le paragraphe 3, ce travail est difficilement comparable à notre étude.

La diminution du taux de protéines ainsi que l'inhibition de la synthèse protéique observées in vitro dans les neurones en culture traités au PhB confirment les résultats d'études antérieures in vivo qui ont mis en évidence chez l'animal traité précocement au PhB un retard de croissance cérébrale accompagné d'une réduction des teneurs en ADN, ARN et protéines du cerveau (Diaz et Schain, 1978 ; Diaz et Coll., 1977 ; Schain et Watanabe, 1975 ; Zemp et Middaugh, 1975). L'étude de la synthèse protéique in vivo dans un système acellulaire obtenu à partir de cerveau de rat immature montre que le PhB uniquement à des doses relativement élevées ($>10^{-3}$M) inhibe l'incorporation de leucine-(^{14}C) dans les protéines (Swaiman et Stright, 1973).

6. EFFETS COMPARATIFS DU PHENOBARBITAL ET D'AUTRES ANTICONVULSIVANTS SUR DES NEURONES EN CULTURE

Dans notre étude concernant les effets des anticonvulsivants sur des neurones en culture, nous nous sommes également intéressés aux effets du diazépam (DZ) sur le développement des neurones (Mémoire G). Les résultats montrent que le DZ affecte la croissance et la morphologie des neurones en cultures mais de manière moins marquée que le PhB. De même, la diminution du transport spécifique du 2DG-(^{3}H) et de la synthèse protéique est moins importante dans les cellules traitées au DZ que dans les cellules traitées au PhB. Cependant, les différences observées entre ces deux médicaments ne sont pas significatives pour les différents paramètres étudiés (test t de Bonferroni).

Culver et Vernadakis (1979) montrent que la diphénylhydantoine (DPH) est plus toxique que le PhB sur des cultures mixtes de neurones et de cellules gliales d'embryons de poulet. Ces auteurs ont étudié les

effets de ces deux médicaments d'une part, sur le nombre et les caractéristiques morphologiques des neurones et d'autre part, sur l'incorporation de la leucine radioactive dans les protéines. De même, Swaiman et Stright (1973) mettent en évidence une inhibition importante de la synthèse protéique induite par la DPH dans un système acellulaire de cerveau de rat immature, alors que le PhB est un inhibiteur peu puissant de la synthèse protéique dans ce système. Plus récemment, l'étude de la toxicité du PhB, de la DPH et de la carbamazépine (CBZ) sur des neurones de cortex d'embryons de souris montrent que des déficits sévères sont observés après une exposition chronique à la DPH ou au PhB. La CBZ affecte de manière moins importante les différents paramètres étudiés parmi ceux-ci, le nombre des neurones en culture et le taux de protéines (Neale et Coll., 1985). Ces auteurs montrent que la DPH présente la toxicité la plus élevée et la CBZ la moins importante. Dow et Riopelle (1988) confirment les résultats précédement cités concernant les effets de différents anticonvulsivants sur la survie et le développement de neurones en culture et montrent que l'acide valproïque produit comme la DPH une inhibition dose-dépendante de la formation des processus neuronaux alors que le PhB et la CBZ ont des effets moins toxiques.

7. CONCLUSION

Une exposition pendant 3 jours au PhB à la dose de 5.10^{-4}M affecte le nombre et la croissance des neurones de cortex cérébral d'embryons de rat en culture. De plus, le PhB diminue significativement le prélèvement spécifique du 2DG-(^{3}H) dans les neurones indiquant une réduction du taux d'utilisation de glucose dans les cellules traitées au PhB par rapport aux cellules témoins. La dépression du métabolisme cellulaire s'accompagne d'une réduction du taux de synthèse des ARN et des protéines dans les neurones traités au PhB.

Il semble exister une bonne corrélation entre les études réalisées in vivo et les études in vitro concernant les effets de ce médicament sur la croissance et le nombre des cellules cérébrales ainsi que sur le métabolisme énergétique et la synthèse protéique dans le cerveau immature.

Cependant, l'étude des effets du PhB sur des cultures de cellules met en évidence des différences en fonction du type de culture, c'est-à-dire les cultures pures de neurones et les cultures mixtes de neurones et de cellules gliales. Les différences observées entre ces deux types de culture sont certainement liées d'une part, à la présence de cellules gliales qui pourraient ne pas être affectées par le traitement et/ou masquer les effets spécifiques du PhB sur les neurones. D'autre part, les cellules gliales pourraient protéger les neurones des effets toxiques du médicament. De plus, la présence de sérum dans le milieu de culture, nécessaire à la croissance des cellules gliales, diminue de manière importante la fraction libre de PhB par liaison de celui-ci aux protéines sériques et en particulier à l'albumine.

L'étude comparative des effets de plusieurs anticonvulsivants sur le développement de neurones en culture montre que la DPH et l'acide valproïque présentent une neurotoxicité élevée. Le PhB induit également des déficits de la croissance et de la maturation des neurones en cultures qui semblent plus importants que ceux observés après une exposition au DZ ou à la CBZ.

CHAPITRE 4

Effets à long terme du phénobarbital sur le comportement du rat adulte (mémoires E et F)

1. EFFETS A LONG TERME DU PHENOBARBITAL SUR L'ACTIVITE LOCOMOTRICE

L'activité locomotrice est mesurée dans un open field (90 x 90 cm) divisé en 36 carrés de 15 x 15 cm chacun. Chaque animal est posé délicatement dans un angle de l'open field et orienté toujours dans la même direction. Le nombre total de carrés traversés ainsi que la fréquence des redressements et des toilettages sont comptabilisés pendant une période de 5 mn. L'activité spontanée de 11 rats témoins et 14 rats traités au PhB a été mesurée dans l'open field.

Les résultats montrent que le PhB n'affecte pas les différents paramètres de l'activité, c'est-à-dire le nombre total de carrés traversés, la fréquence des redressements et des toilettages mesurés sur une période de 5 mn (figure 1). Cependant, si on considère le nombre total de carrés traversés au cours de chaque mn de test, celui-ci est significativement diminué à la 3e mn ($p < 0,02$) et à la 4e mn ($p < 0,05$, test U de Mann-Whitney) chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins (figure 2). De plus, une analyse de variance à une voie montre une hétérogéneité significativement plus importante à la 5e mn chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins ($F = 3,44$, $p < 0,025$).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Diaz et Schain (1978) qui montrent une diminution à court terme de l'activité locomotrice de jeunes rats âgés de 18 jours traités à partir du 5e jour par du PhB à la dose de 60 mg/kg/j. Par contre, à la dose de 15 mg/kg, le PhB n'affecte pas l'activité des animaux. De plus, ces auteurs notent chez les animaux traités au PhB une augmentation de la réactivité par rapport aux témoins lors d'un stimulus brutal (son et lumière) apparaissant à la fin du test d'activité en open field. Fonseca et Coll. (1976) montrent qu'un traitement chronique précoce au PhB à 10 ou 20 mg/kg n'affecte pas à long terme l'activité locomotrice des rats mâles mais diminue significativement l'activité des femelles. Ces auteurs montrent également que dans le groupe des rats traités au PhB, aucune différence d'activité liée au sexe n'apparaît alors que chez les animaux témoins, les femelles ont une activité significativement plus élevée que les animaux mâles.

Figure 1 : Effets d'un traitement chronique précoce au PhB sur l'activité motrice du rat adulte dans un open field. Les rats reçoivent une injection sous-cutanée de PhB à la dose de 50 mg/kg/j du 2e au 35e jour de vie postnatale et sont testés à 80 jours. Les valeurs représentent les médianes du nombre total de carrés traversés et de la fréquence des redressements et des toilettages au cours des 5 mn de test chez 11 rats témoins et 14 rats traités au PhB.

1. EFFETS A LONG TERME DU PHENOBARBITAL SUR L'ACTIVITE LOCOMOTRICE

L'activité locomotrice est mesurée dans un open field (90 x 90 cm) divisé en 36 carrés de 15 x 15 cm chacun. Chaque animal est posé délicatement dans un angle de l'open field et orienté toujours dans la même direction. Le nombre total de carrés traversés ainsi que la fréquence des redressements et des toilettages sont comptabilisés pendant une période de 5 mn. L'activité spontanée de 11 rats témoins et 14 rats traités au PhB a été mesurée dans l'open field.

Les résultats montrent que le PhB n'affecte pas les différents paramètres de l'activité, c'est-à-dire le nombre total de carrés traversés, la fréquence des redressements et des toilettages mesurés sur une période de 5 mn (figure 1). Cependant, si on considère le nombre total de carrés traversés au cours de chaque mn de test, celui-ci est significativement diminué à la 3e mn ($p < 0,02$) et à la 4e mn ($p < 0,05$, test U de Mann-Whitney) chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins (figure 2). De plus, une analyse de variance à une voie montre une hétérogéneité significativement plus importante à la 5e mn chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins ($F = 3,44$, $p < 0,025$).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Diaz et Schain (1978) qui montrent une diminution à court terme de l'activité locomotrice de jeunes rats âgés de 18 jours traités à partir du 5e jour par du PhB à la dose de 60 mg/kg/j. Par contre, à la dose de 15 mg/kg, le PhB n'affecte pas l'activité des animaux. De plus, ces auteurs notent chez les animaux traités au PhB une augmentation de la réactivité par rapport aux témoins lors d'un stimulus brutal (son et lumière) apparaissant à la fin du test d'activité en open field. Fonseca et Coll. (1976) montrent qu'un traitement chronique précoce au PhB à 10 ou 20 mg/kg n'affecte pas à long terme l'activité locomotrice des rats mâles mais diminue significativement l'activité des femelles. Ces auteurs montrent également que dans le groupe des rats traités au PhB, aucune différence d'activité liée au sexe n'apparaît alors que chez les animaux témoins, les femelles ont une activité significativement plus élevée que les animaux mâles.

Au contraire, après une exposition prénatale au PhB, une hyperactivité a été mise en évidence chez la souris traitée par le barbiturique pendant la dernière semaine de la gestation. Chez les animaux de 21 jours, l'augmentation de l'activité locomotrice concerne uniquement les mâles (Middaugh et Coll., 1981a) alors que chez l'adulte, les animaux des deux sexes présentent une hyperactivité après un traitement prénatal au PhB (Middaugh et Coll., 1975, 1981b). Une augmentation de la réactivité à un stimulus (son et lumière) a également été observée chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins. Chez le rat, Martin et Coll. (1985) montrent que l'hyperactivité observée chez des animaux traités in utero au PhB apparaît vers le 13e jour de vie postnatale et persiste à l'âge adulte.

Il apparaît que les effets du PhB sur l'activité locomotrice dépendent de plusieurs paramètres qui sont en particulier, la période du développement pendant laquelle le médicament est administré, la durée du traitement, la dose utilisée, le sexe de l'animal ainsi que son âge au moment du test comportemental. On note une hyperactivité des animaux après une exposition prénatale au PhB, celle-ci apparaît au cours du développement et persiste à l'âge adulte. Une exposition néonatale au PhB peut induire à court et à long terme soit une dépression soit aucune variation de l'activité locomotrice.

2. EFFETS A LONG TERME DU PHENOBARBITAL SUR LE COMPORTEMENT DANS UN LABYRINTHE EN T : ALTERNANCE SPONTANEE

Le test est réalisé dans un labyrinthe en T en bois gris avec des parois de 15 cm de haut, constitué d'un compartiment de départ (15 x 15 cm), d'un tronc commun (35 x 15 cm) et de 2 branches (50 x 15 cm chacune).

L'animal est placé dans le compartiment de départ fermé par une porte guillotine. Lorsque l'animal est face à la porte, celle-ci est levée pour lui permettre l'accès au labyrinthe. Dès que le rat atteint une des branches (lorsque les 4 pattes ont dépassé l'embranchement), il est retiré du labyrinthe et remis dans le compartiment de départ. Un

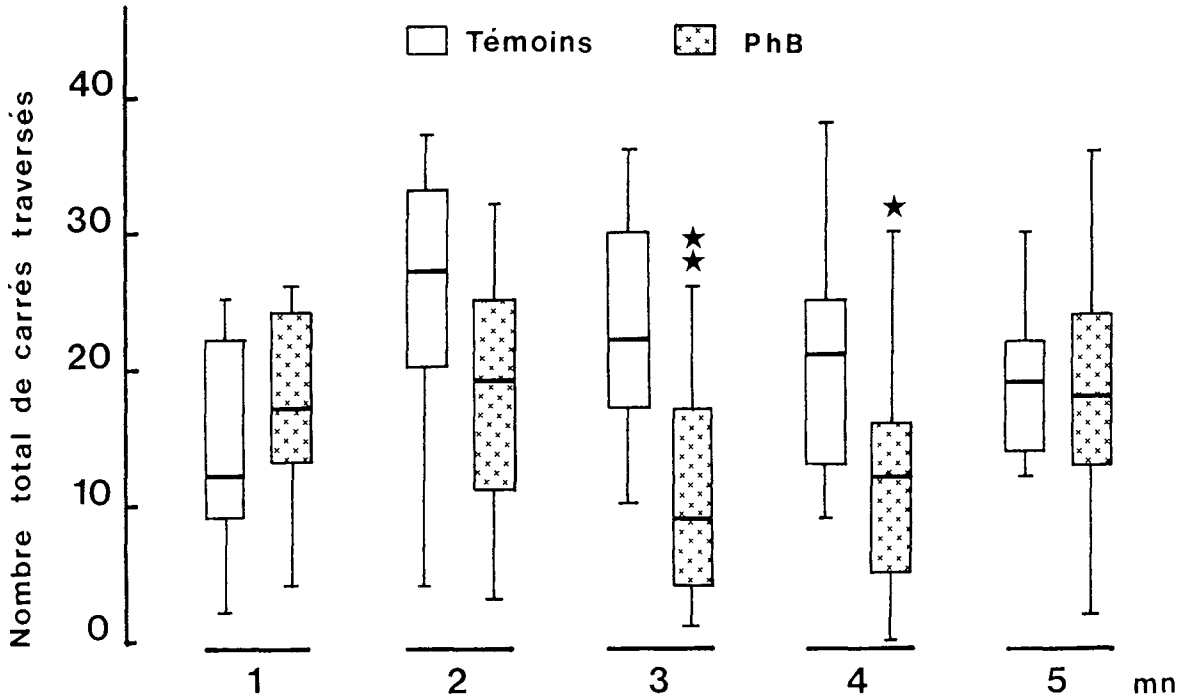


Figure 2 : Effets d'un traitement chronique précoce au PhB sur l'activité locomotrice du rat adulte dans un open field. Les rats reçoivent une injection sous-cutanée de PhB à la dose de 50 mg/kg/j du 2e au 35e jour de vie post-natale et sont testés à 80 jours.
Les diagrammes représentent les médianes, les quartiles inférieurs et supérieurs et les valeurs extrêmes du nombre total de carrés traversés chez 11 rats témoins et 14 rats traités au PhB à chaque minute de test.
* $p < 0,05$, * * $p < 0,002$, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins (test U de Mann-Whitney).

temps maximum de 5 mn par essai est accordé (une alternance est égale à 2 essais consécutifs). Le temps nécessaire pour pénétrer dans chacune des branches du labyrinthe est mesuré. Chaque animal réalise une alternance par jour pendant 5 jours consécutifs. Lorsqu'un rat n'a pas réussi un essai en un temps maximum de 5 mn il est retiré du labyrinthe.

Les animaux sont divisés en deux groupes. La moitié des animaux (28 témoins et 28 rats traités au PhB) est testée sans délai entre les deux essais (alternance spontanée sans délai) et pour l'autre moitié des animaux, un délai de 30 s est imposé entre les deux essais (alternance spontanée avec délai).

Si on considère le pourcentage d'animaux capables de réaliser chaque essai dans un temps maximum de 5 mn, on n'observe aucune différence entre les deux groupes d'animaux sauf pour le 1er jour de test dans l'alternance avec délai où seulement 67 % des animaux traités au PhB ont réussi leur test dans la limite de temps imparti pour chaque essai, soit 5 mn ($p < 0,01$, test du Chi deux) (tableau 1). Seuls les animaux ayant réussi leur essais en moins de 5 mn pendant les 5 jours de test ont été inclus dans la suite de l'étude.

Un traitement précoce au PhB induit une réduction de 25 % du taux d'alternance des animaux pendant les cinq jours de test si on introduit un délai de 30 s entre les deux essais consécutifs (tableau 2) ($p < 0,05$, test t de Student). De plus, les temps nécessaires pour réaliser les essais dans le labyrinthe sont augmentés de 50 à 200 % chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins. Les différences sont significatives quels que soient le jour et l'essai et dans les deux procédures d'alternance spontanée ($p < 0,01$, test U de Mann-Whitney). La figure 3 représente les temps réalisés au cours de l'alternance spontanée avec délai.

L'alternance spontanée est une tendance qu'ont les animaux matures à alterner des réponses successives face à des choix équivalents. Ainsi, des rats témoins placés dans un labyrinthe en T tendent à choisir alternativement les deux branches du labyrinthe lors d'essais

TABLEAU 1 : Pourcentage d'animaux ayant réalisé chaque essai dans un labyrinthe en T dans un temps maximal de 5 mn

		JOURS				
		1	2	3	4	5
Alternance sans délai	T	100	100	100	100	93
	PhB	85	85	81	89	93
Alternance avec délai	T	100	100	100	96	100
	PhB	67**	96	93	96	93

** $p < 0,01$, différence statistiquement significative par rapport aux témoins (test du Chi deux).

consécutifs (Douglas, 1966 ; Isaacson, 1982). Dans notre étude, nous avons montré qu'une exposition précoce au PhB induit une diminution du pourcentage d'alternance lorsqu'un délai est introduit entre les deux essais. De plus, les animaux traités au PhB sont plus lents dans la réalisation de leurs essais que les animaux témoins. Chez le rat, McBride et Coll., (1985) montrent qu'une exposition postnatale au PhB n'affecte pas à long terme le comportement dans un labyrinthe en T en milieu aquatique. Cependant, un traitement prénatal chez le rat induit des déficits de l'alternance spontanée et des performances dans différents labyrinthes (Armitage, 1952 ; Murai, 1966). Nos résultats sont en accord avec ceux observés par Pick et Yanai (1984) qui montrent une diminution du taux d'alternance chez des souris traités précocement au PhB que ce soit en période prénatale ou néonatale. Chez la souris, une exposition néonatale au PhB induit à court et à long terme une diminution significative de 19 à 36 % du pourcentage d'alternance, alors qu'une exposition prénatale au PhB n'affecte pas significativement le taux d'alternance des animaux. Cependant, si un délai de 30 s est introduit entre les deux essais consécutifs, on observe une réduction de 31 à 34 % du pourcentage d'alternance chez les souris traitées in utero au PhB par rapport aux témoins. Ces résultats montrent qu'une exposition néonatale au PhB chez la souris induit des perturbations du comportement dans un labyrinthe plus importantes que celles observées après une exposition prénatale (Pick et Yanai, 1984). Ces auteurs attribuent cette différence aux déficits cellulaires plus étendus après une exposition néonatale qu'après une exposition prénatale au PhB (Yanai et Bergman, 1981 ; Yanai et Coll., 1979).

En effet, l'alternance spontanée est bien corrélée à l'hippocampe (Douglas, 1966, 1975) ; ainsi des lésions de l'hippocampe perturbent ce comportement en réduisant le taux d'alternance (Douglas, 1975 ; Isaacson, 1982 ; Roberts et Coll., 1962). Cependant, les déficits de l'alternance spontanée observés chez des rats ayant subi des lésions de l'hippocampe sont réversibles si les tests sont répétés (Douglas, 1975 ; Isseroff, 1979 ; Kimble, 1976) ou si un renforcement est ajouté pour un choix correct (Jackson et Strong, 1969). Ces études ont montré que des lésions de l'hippocampe n'affectent pas les mécanismes sous-jacents à

TABLEAU 2 : Effets d'un traitement précoce au phénobarbital sur les taux d'alternance spontanée dans un labyrinthe en T

	Alternance sans délai (%)	Alternance avec délai (%)
Témoins	67.6 ± 4.4 (26)	60.8 ± 4.0 (27)
Phénobarbital	60.0 ± 6.4 (19)	45.8 ± 7.6* (14)

Les valeurs représentent des moyennes ± D.S. du pourcentage d'alternance au cours des cinq jours de test. Le nombre d'animaux est indiqué entre parenthèses.

* $p < 0,05$, différence statistiquement significative par rapport aux témoins (test t de Student).

l'expression de ce comportement mais induiraient plutôt des perturbations de la mémoire (Isseroff, 1979). En effet, les déficits de l'alternance spontanée apparaissant lors de l'introduction d'un délai entre les deux essais dans un labyrinthe en T sont caractéristiques d'un disfonctionnement de la mémoire (Pinsker et French, 1967). Isseroff (1979) a observé chez des rats ayant des lésions importantes au niveau de l'hippocampe, une réduction du taux d'alternance quand un délai de 10 s est imposé entre les deux essais alors que ces animaux ne présentent aucun déficit dans un test d'alternance sans délai. Ces résultats semblent confirmer l'hypothèse que les déficits du comportement dans un labyrinthe en T survenant après des lésions de l'hippocampe seraient dus à une perte de mémoire et non à une perte de la motivation à réaliser le test comme l'avait suggéré précédemment Douglas (1975).

Bayer et Coll. (1973) montrent que si on empêche la prolifération des cellules granulaires du gyrus denté de l'hippocampe, on observe chez le rat des perturbations du comportement similaires à celles observées après une destruction de l'hippocampe chez l'adulte. Ces résultats mettent en évidence le rôle important des cellules granulaires dans la fonction de l'hippocampe. Ces cellules qui se forment après la naissance chez les rongeurs sont particulièrement sensibles au PhB (Yanai et Bergman, 1981).

Dans notre étude, nous avons uniquement pris en considération les performances des animaux ayant effectué leurs essais en un temps maximum de 5 mn. Chez les témoins 93 et 96 % des animaux ont été inclus dans les deux test d'alternance alors que seulement 68 et 50 % des rats traités au PhB ont pu être retenus. Les animaux traités au PhB qui ont été exclus de l'étude avaient un comportement très hésitant, ne semblant pouvoir se décider à avancer, reculer ou encore rester sur place. Ce comportement a également été observé dans l'open field chez les rats traités au PhB. Cependant, il existe peu d'informations dans la littérature sur des déficits cellulaires éventuels au niveau de l'hippocampe du rat après une exposition précoce aux barbituriques. Jacobson et Coll. (1988) montrent chez le rat qu'un traitement prénatal

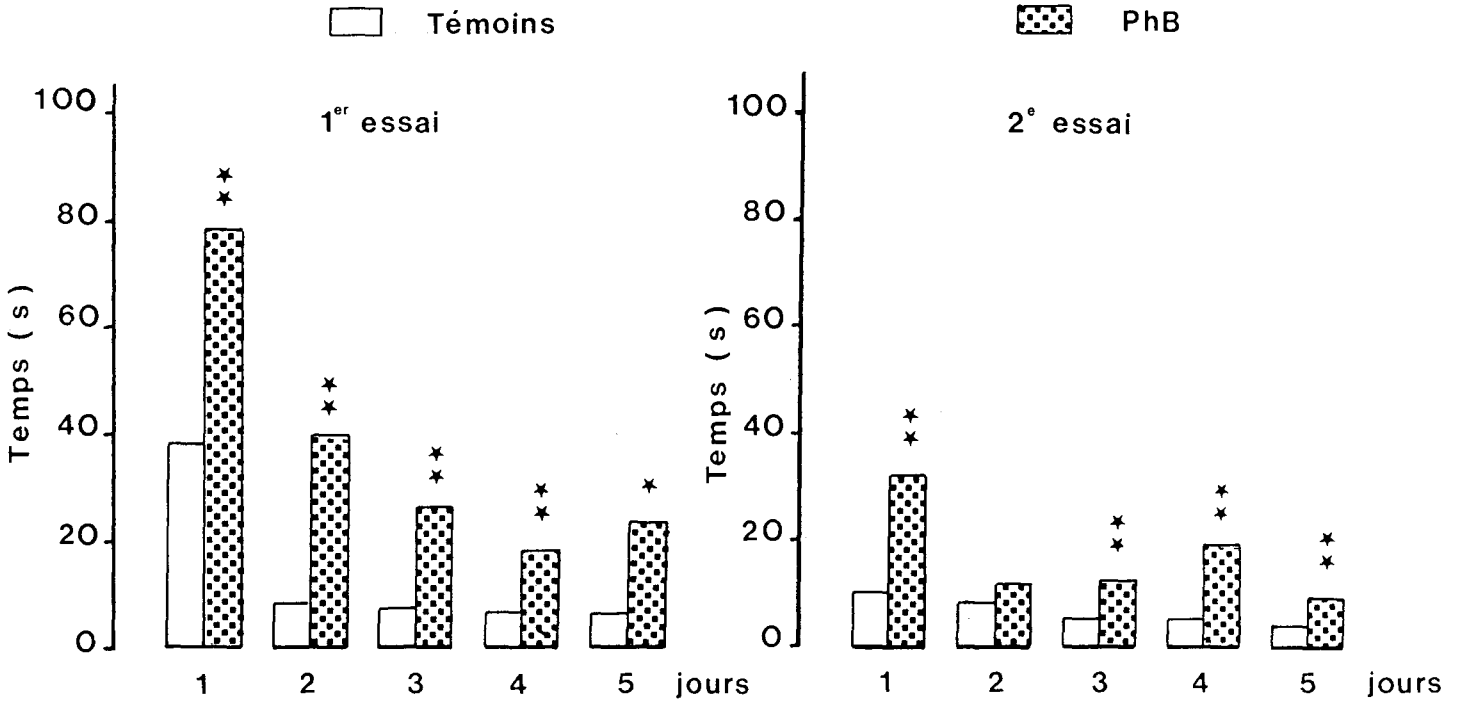


Figure 3 : Effets d'un traitement chronique précoce au PhB sur les temps nécessaires pour atteindre une des deux branches du labyrinthe en T au cours des deux essais dans l'alternance spontanée avec délai. Les rats reçoivent une injection sous-cutanée de PhB à la dose de 50 mg/kg/j du 2e au 35e jour postnatal et sont testés à 70 jours.
Les graphes représentent les médianes de 27 témoins et 14 rats traités au PhB.
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins (test U de Mann- Whitney).

au PhB à la fin de la gestation induit un retard important du developpement de l'arborisation dendritique des cellules de la région CA1 de l'hippocampe. Hannah et Coll. (1982, 1988) ont étudié uniquement le cervelet et ont montré une réduction du nombre des cellules de Purkinje au niveau de cette structure après une exposition néonatale au PhB. Par contre, chez la souris les études sont plus nombreuses et ont démontré qu'un traitement pré ou postnatal au PhB induit des destructions cellulaires importantes, en particulier au niveau du cervelet et de l'hippocampe (Yanai et Bergman, 1981 ; Yanai et Coll., 1979).

Chez le rat, la mesure des taux d'utilisation cérébrale locale de glucose montre qu'un traitement chronique précoce au PhB induit une diminution à long terme de l'UCLG dans trois structures de l'hippocampe considérées dans leur ensemble, l'hippocampe dorsal, l'hippocampe ventral et le gyrus denté (figure 9, chap. 2). Cependant, un tel traitement n'affecte pas l'UCLG dans les différentes couches cellulaires de l'hippocampe dans la région CA1, CA3 et le gyrus denté sauf au niveau de la couche formée par les cellules pyramidales de la région CA3 où l'utilisation de glucose est diminué de 7 % (tableau 2, chap. 2).

En conclusion, l'intégrité de l'hippocampe semble être un facteur important déterminant les performances dans un labyrinthe en T. Cependant, en plus de l'hippocampe, d'autres régions cérébrales comme le cortex cérébral et le cervelet sont également impliquées dans l'expression de ce comportement (Golwitz et Koch, 1986 ; Kolb et Coll., 1983). Chez la souris traitée au PhB en période pré ou postnatale, les déficits de l'alternance spontanée dans un labyrinthe en T semblent en partie du moins liés à des destructions cellulaires spécifiques au niveau de l'hippocampe (Pick et Yanai, 1984). Chez le rat, l'absence d'étude neuromorphologique au niveau de l'hippocampe ne permet pas de relier des altérations du comportement à des déficits cellulaires. Dans notre étude, les perturbations à long terme du comportement chez les rats traités au PhB sont accompagnées d'une dépression des taux d'UCLG

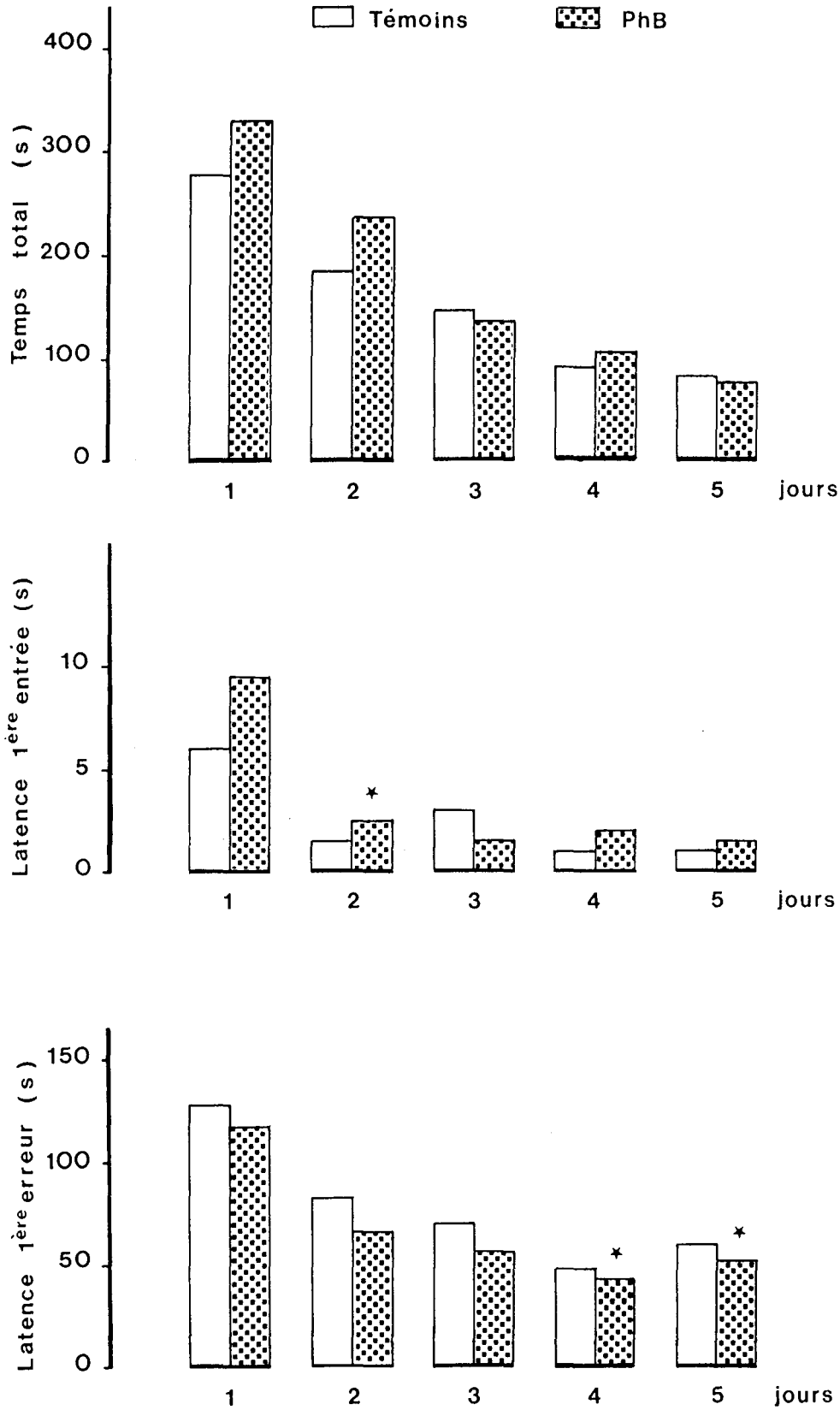


Figure 4 : Effets d'un traitement chronique précoce au PhB sur le comportement dans un labyrinthe à 8 branches. Les rats reçoivent une injection de PhB à la dose de 50 mg/kg/j du 2e au 35e jour postnatal et sont testés à 90 jours. Le diagramme supérieur représente les médianes du temps total pour réaliser les essais au cours des 5 jours de test chez 14 rats témoins et 14 rats traités au PhB. Le diagramme intermédiaire représente les médianes du temps de latence d'entrée dans la 1ère branche du labyrinthe et le diagramme inférieur, le temps de latence de la 1ère erreur.

* $p < 0,05$, différence statistiquement significative par rapport aux témoins (test U de Mann-Whitney).

dans un certain nombre de structures, parmi celles-ci les aires corticales, le cervelet et l'hippocampe. Cependant, le PhB n'affecte pas l'utilisation de glucose dans les différentes couches cellulaires de l'hippocampe.

3. EFFETS A LONG TERME DU PHENOBARBITAL SUR LE COMPORTEMENT DANS UN LABYRINTHE A HUIT BRANCHES

Les animaux ont été testés dans un labyrinthe à 8 branches en bois gris. Chaque branche (60 x 12 x 17 cm, longueur x largeur x hauteur) représente la projection d'un côté d'une plateforme octogonale centrale de 50 cm de diamètre. Un boulette de nourriture (45 mg) est placée à l'extrémité de chaque branche et n'est pas remplacée au cours du test, si bien qu'un maximum de 8 récompenses peut être obtenu.

Seize animaux témoins et 16 rats traités au PhB ont été testés dans le labyrinthe. Auparavant, ces animaux ont subi une diète hydrique afin de ramener leur poids à 85 % de sa valeur initiale et sont maintenus à ce poids pendant toute la durée du test.

L'animal est placé au centre de la plateforme, face à une même une branche pour chaque test (les branches du labyrinthe sont numérotées de 1 à 8) et pour chaque rat. Les animaux sont laissés dans le labyrinthe jusqu'à ce qu'ils aient visité les 8 branches (les 4 pattes ayant dépassé l'embranchement) ou que 15 mn se soient écoulées. Pour chaque test, le temps d'entrée dans chaque branche, le numéro de chaque branche visitée ainsi que l'ordre dans lequel celles-ci sont visitées ont été relevés. Tous les animaux ont été testés pendant 5 jours consécutifs, une fois par jour. Les animaux n'ayant pas visité les 8 branches du labyrinthe dans le temps accordé (15 mn) ont été retirés du labyrinthe et éliminés de l'étude.

Parmi les animaux testés dans ce labyrinthe, deux rats dans chaque groupe n'ont pas réussi le test, c'est-à-dire visiter les 8 branches du labyrinthe en un temps maximum de 15 mn et ont été retirés de l'étude.

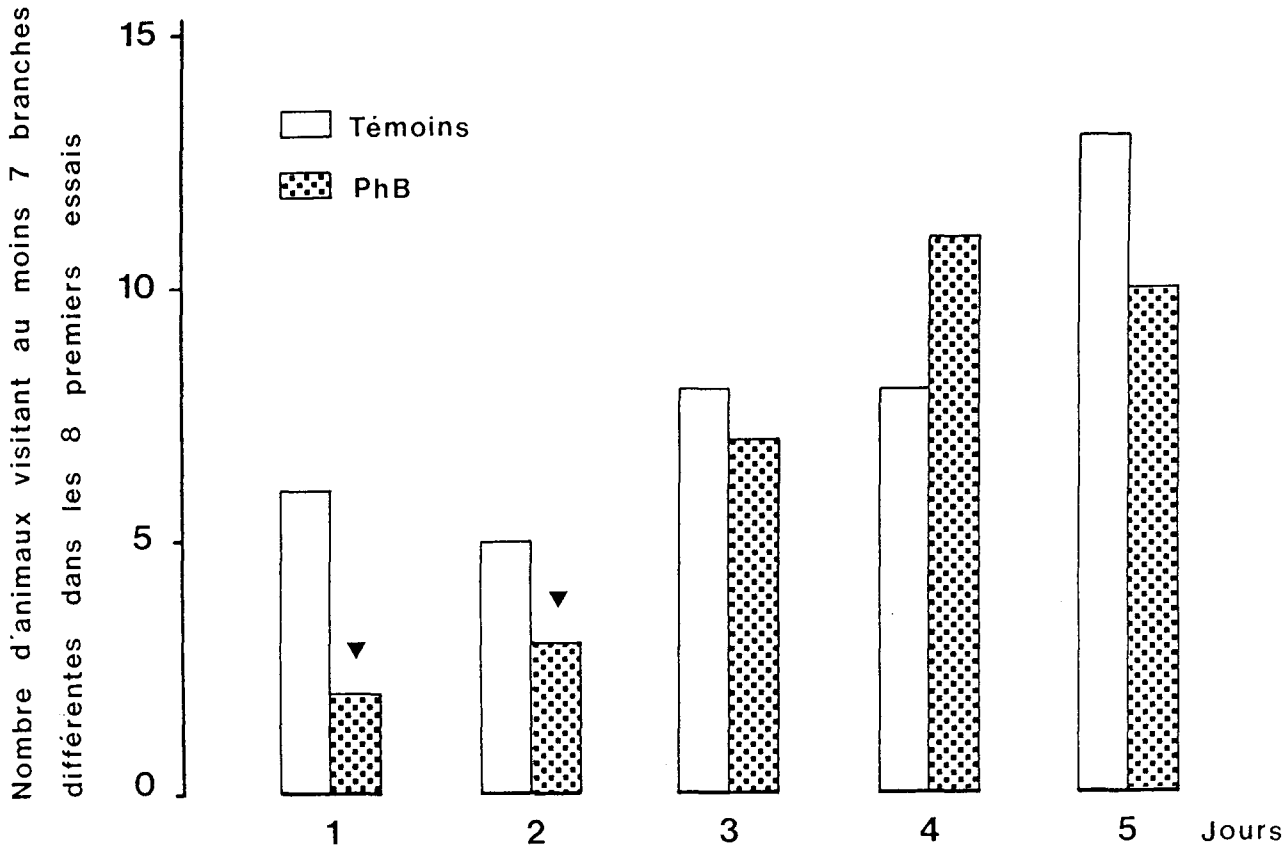


Figure 5 : Effets d'un traitement chronique précoce au PhB sur le nombre d'animaux visitant au moins 7 branches différentes dans les 8 premiers essais dans un labyrinthe à 8 branches. Les rats reçoivent une injection de PhB à la dose de 50 mg/kg/j du 2e au 35e jour postnatal et sont testés à 90 jours. Les triangles noirs sont pointés sur les groupes d'animaux dans lesquels la probabilité de choisir 7 branches différentes dans les 8 premiers essais est ramenée au hasard (voir appendice statistique).

Les résultats montrent qu'une exposition précoce au PhB n'affecte pas de manière importante le comportement dans un labyrinthe à 8 branches. Comme le montre la figure 4, le temps total pour réaliser le test n'est pas significativement différent dans les deux groupes d'animaux. Le temps de latence d'entrée dans la première branche du labyrinthe est significativement augmenté chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins uniquement au 2e jour du test ($p < 0,05$, test U de Mann-Whitney). Le temps de latence de la 1ère erreur est significativement réduit au 4e et 5e jour chez les animaux traités par rapport aux témoins ($p < 0,05$) (figure 4).

Si on considère que chaque choix est totalement indépendant des autres choix, la probabilité de choisir n branches différentes au cours des 8 premiers essais suit une loi binomiale (voir appendice statistique). Si on prend en compte le nombre de d'animaux visitant au moins 7 branches différentes au cours des 8 premiers essais ainsi que l'indique la figure 5, le nombre de rats capables d'atteindre ce critère augmente au cours des 5 jours de test, que les rats aient été traités par du sérum physiologique ou du PhB. Au 5e jour, tous les animaux témoins réussissent le critère de choix de 7 branches différentes dans les 8 premiers essais (Olton et Samuelson, 1976 ; figure 5). En effet, dans un labyrinthe à 8 branches, les rats apprennent rapidement à faire leur choix en évitant les branches déjà visitées (Olton et Coll., 1981). Comme le montre la figure 5, aux jours 1 et 2 du test, l'exposition au PhB induit une diminution du nombre d'animaux capables de visiter 7 branches différentes au cours des 8 premiers essais et ramène ainsi au hasard la probabilité d'atteindre ce critère pour les animaux traités au PhB (ainsi que l'indiquent les flèches sur la figure 5), alors que tous les autres cas correspondent à ce que l'on peut appeler un "choix raisonné" (voir appendice statistique).

Pour réaliser l'épreuve, l'animal peut utiliser une ou plusieurs stratégies. Nous avons analysé les différentes branches visitées au cours des 8 premiers essais afin de déterminer si les rats utilisent une séquence particulière pour simplifier le test. Dans la stratégie 1, le

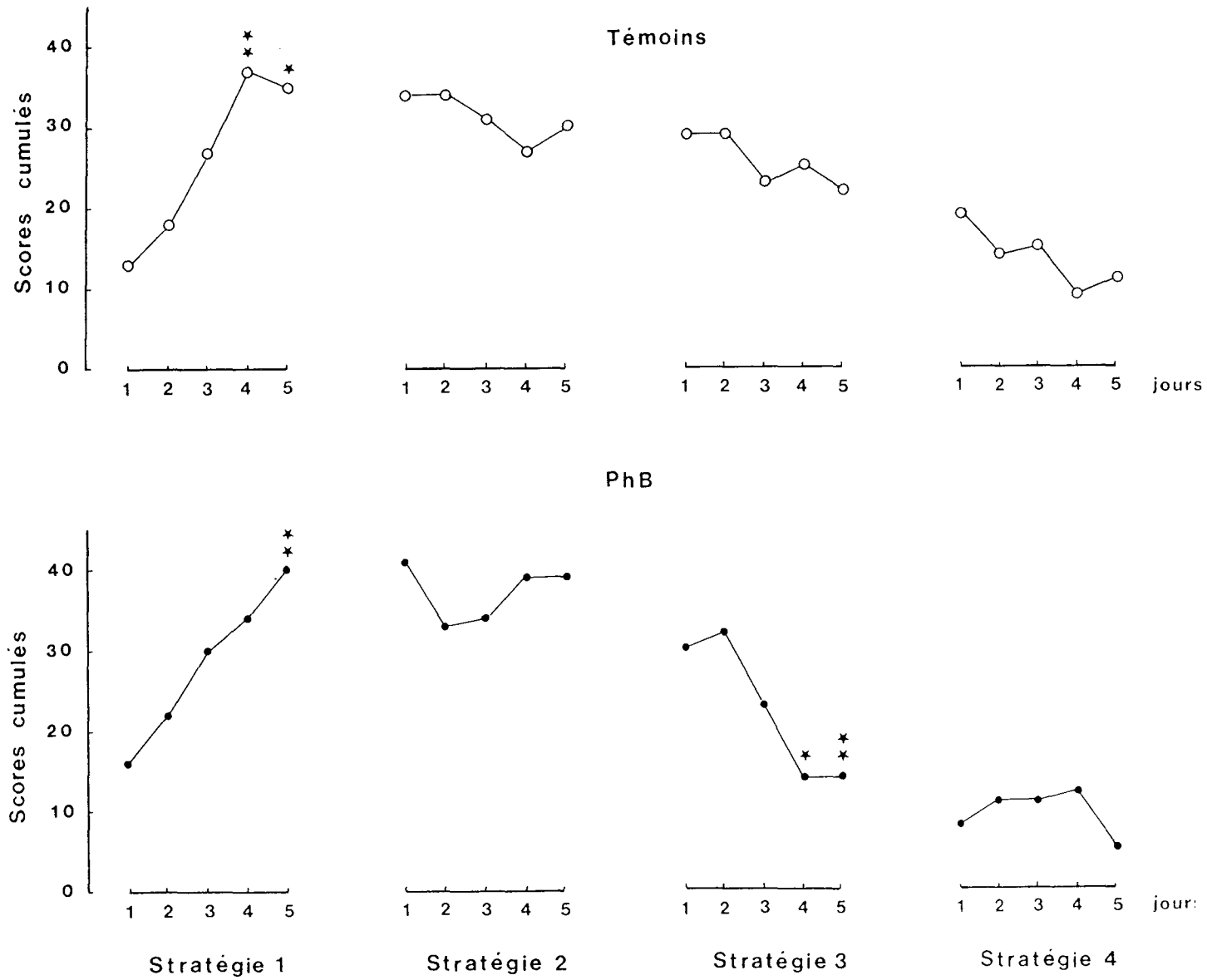


Figure 6 : Effets d'un traitement chronique précoce au PhB sur les différentes stratégies utilisées par 14 rats témoins et 14 rats traités au PhB dans un labyrinthe à 8 branches. Les animaux reçoivent une injection sous-cutanée de PhB à la dose de 50 mg/kg/j du 2e au 35e jour post-natal et sont testés à 90 jours. La stratégie 1 consiste à choisir la branche située à 45° de la précédente; dans la stratégie 2, le rat choisit la branche située à 90° de la précédente; dans les stratégies 3 et 4, l'animal choisit la branche située respectivement à 135° et à 180° de la précédente.
* $p < 0,05$, * * $p < 0,01$, différences statistiquement significatives entre un jour donné et le jour 1 (test t de Student).

rat choisit une branche adjacente à celle qu'il vient de visiter ; dans la stratégie 2, il choisit la branche située à 90° ; dans la stratégie 3, le rat choisit la branche à 135° ; dans la stratégie 4, il choisit la branche face à lui, c'est-à-dire à 180°.

Les résultats de la figure 6 montrent que les rats n'utilisent apparamment pas de stratégie dans ce labyrinthe comme l'avaient montré précédemment Olton et Samuelson (1976). La stratégie 4 est peu utilisée par les animaux des deux groupes. De même, les rats n'ont pas tendance à choisir une branche adjacente (stratégie 1) au cours des deux premiers jours de test, puis la fréquence d'utilisation de la stratégie 1 augmente d'environ 3 fois sur les 5 jours de test. En effet, Magni et Coll. (1979) montrent chez le rat que le pourcentage de choix d'une branche adjacente augmente avec le nombre d'essais. Comme le montre la figure 6, si on prend le jour 1 comme référence, la stratégie 1 est significativement plus utilisée au jour 4 ($p < 0,01$, test t de Student) et au jour 5 ($p < 0,05$) chez les témoins et au jour 5 ($p < 0,01$) chez les animaux traités au PhB. Dans ce groupe d'animaux, l'augmentation de l'utilisation de la stratégie 1 semble compensée par une diminution significative de l'utilisation de la stratégie 3 au jour 4 ($p < 0,05$) et au jour 5 ($p < 0,01$). En général, dans ce type de test, les animaux témoins semblent utiliser plus fréquemment les stratégies 2 et 3, c'est-à-dire les branches situées à 90° et 135° de la précédente (Olton et Samuelson, 1976). Dans notre étude, les animaux témoins utilisent principalement les stratégies 1, 2 et 3 aux jours 4 et 5, alors que les animaux traités au PhB n'utilisent de préférence que les stratégies 1 et 2, c'est-à-dire les branches proches de celle qu'ils viennent de visiter (figure 6). Ces résultats semblent montrer que le PhB pourrait affecter les capacités d'orientations spatiales dans un environnement complexe.

Le comportement dans un labyrinthe à 8 branches qui est un test plus difficile et plus sophistiqué que l'alternance spontanée, contient une composante d'alternance (Olton et Samuelson, 1976) et est bien

correlée électro-physiologiquement à l'hippocampe (Olton et Coll., 1978). Olton et Samuelson (1976) et Olton (1979) montrent que des animaux ayant des lésions de l'hippocampe ont des performances réduites dans ce type de labyrinthe.

De plus, les performances dans un labyrinthe à 8 branches sont liées à l'intégrité de plusieurs systèmes de neurotransmetteurs au niveau de l'hippocampe et l'influence du système cholinergique semble prédominante (Eckerman et Coll., 1980 ; Low et Coll., 1982 ; Walsh et Coll., 1984 ; Yanai et Coll., 1987). Les progrès réalisés dans le domaine de la transplantation de tissu cérébral ont permis de montrer qu'il est possible de suprimer des déficits comportementaux induits par différentes manipulations expérimentales ou par des déficiences d'origine génétique (Bjorklund et Sténevi, 1984 ; Perlow, 1987).

Chez la souris, Kleinberger et Yanai (1985) ainsi que Pick et Yanai (1985) montrent qu'un traitement pré ou postnatal au PhB induit une augmentation significative du nombre d'erreurs ainsi que du temps nécessaire pour atteindre le critère de 8 réponses correctes dans les 8 premiers essais. Yanai et Pick (1988) montrent que des transplants de neurones principalement cholinergiques sont capables d'améliorer considérablement les performances dans un labyrinthe à 8 branches chez des souris traitées au PhB en période prénatale par rapport à des animaux traités au PhB n'ayant pas subit de transplantation. Ces auteurs montrent également que des transplants riches en neurones noradrénergiques n'améliorent pas le comportement des souris traitées au PhB. Ces résultats suggèrent que le PhB pourrait induire des déficits comportementaux en altérant l'innervation cholinergique de l'hippocampe. Ces résultats ont été confirmé par Yanai et Coll. (1989) qui ont montré que l'augmentation de l'innervation cholinergique au niveau des voies septo-hippocampiques par destruction des voies dopaminergiques au niveau du septum améliore les performances dans un labyrinthe à 8 branches des souris traitées in utero au PhB.

Dans notre étude, les animaux traités au PhB ne présentent que des déficits transitoires du comportement dans un labyrinthe à 8 branches alors que chez la souris, les perturbations comportementales sont plus marquées. Les différences observées entre le rat et la souris dans les effets à long terme sur le comportement pourraient être liées à une sensibilité différente des cellules de l'hippocampe au PhB en fonction de l'espèce animale.

La question qui se pose est de savoir pourquoi un traitement précoce au PhB induit des déficits permanents de l'alternance spontanée qui n'existent pas dans le labyrinthe à 8 branches, test plus difficile et contenant cependant une composante d'alternance. En fait, dans le labyrinthe à 8 branches, les animaux sont soumis à un jeûne partiel avant l'expérimentation et reçoivent une récompense pour chaque entrée correcte dans une branche du labyrinthe. Cette motivation qui n'existe pas dans le labyrinthe en T semble être un bon stimulant pour les animaux traités au PhB. En effet, certains animaux traités au PhB ont un comportement très hésitant avec même parfois une incapacité à réaliser l'épreuve dans un temps donné dans le labyrinthe en T.

En conclusion, un traitement précoce au PhB induit des déficits à long terme du comportement qui se traduisent en particulier, par un ralentissement important des animaux et des déficits de l'alternance spontanée avec délai dans un labyrinthe en T. Dans le labyrinthe à 8 branches, un tel traitement induit des perturbations transitoires des performances en situation d'apprentissage spatial sans affecter le temps de réalisation des tests. Il apparaît également que les conséquences à long terme des barbituriques sur le comportement du rat adulte sont variables d'un individu à l'autre. Certains rats traités au PhB ont un comportement identique aux témoins alors que d'autres sont hésitants et semblent incapables de se décider à se déplacer. Ceci se traduit par une hétérogénéité importante des résultats obtenus dans le groupe des animaux traités au PhB, en particulier dans l'open field et le labyrinthe en T. L'hétérogénéité du comportement a également pu être observée en clinique chez des enfants au cours d'une thérapie anticonvulsivante au PhB. En effet, certains enfants présentent des

perturbations importantes du comportement, le plus souvent il s'agit d'une hyperactivité ainsi que des altérations de la fonction cognitive alors que d'autres enfants ne présentent aucun de ces symptômes (Behrman et Vaughan, 1987 ; De Ajuriaguerra et Marcelli, 1989 ; Dodson, 1989 ; Mattson et Cramer, 1982 ; Stores, 1981 ; Wolf et Forsythe, 1978). Chez l'enfant, les troubles du comportement qui apparaissent au cours d'une exposition au PhB ne semblent pas corrélés aux taux circulants de médicament et diminuent voire disparaissent à l'arrêt du traitement (Mattson et Cramer, 1982 ; Wolf et Forsythe, 1978).

APPENDICE STATISTIQUE

Modèle statistique

Dans un labyrinthe à 8 branches, nous pouvons considérer que l'expérience peut être définie comme les 8 premières entrées dans les différentes branches du labyrinthe. Toute expérience de ce type se traduit par une séquence définie d'entrées qui peuvent être représentées comme une permutation avec répétition. Si l'hypothèse est que chaque choix est indépendant de tous les autres, alors les probabilités de visiter n branches différentes au cours des 8 premières entrées sont les suivantes : $n = 8$, $p = 0.0024$; $n = 7$, $p = 0.0673$; $n = 6$, $p = 0.3196$; $n = 5$, $p = 0.4206$; $n = 4$, $p = 0.1703$; $n = 3$, $p = 0.0193$; $n = 2$, $p = 0.0004$; $n = 1$, $p = 0$.

Test statistique

Dans le modèle choisi pour cette étude, $P(X > 7) = 0.0697 = p$, on teste l'hypothèse H_0 avec $P(X > 7) = 0.0697$ (choix au hasard) contre l'hypothèse H_1 avec $P(X > 7) > 0.0697$ ("choix raisonné").

La variable Z est définie comme le nombre de rats obtenant un score d'au moins 7 branches différentes visitées au cours des 8 premiers essais, pour un nombre total de 14 rats testés.

Sous H_0, Z suit une loi binomiale β (14 ; 0.0697).
Sous H_1, Z suit une loi binomiale β ((14 ; $P > 0.0697$).

Le test statistique est un test unilatère avec le domaine de rejet de H_0 à droite. Les calculs sont les suivants :

	Probabilités cumulées
P (Z = 0) = 0.3637	0.3637
P (Z = 1) = 0.3815	0.7452
P (Z = 2) = 0.1858	0.9310
P (Z = 3) = 0.0556	0.9866
P (Z = 4) = 0.0114	0.9980
P (Z = 5) = 0.0017	0.9997
P (Z = 6) = 0.0002	0.9999

Si nous considérons le nombre d'animaux capables de visiter au moins 7 branches différentes au cours des 8 premiers essais :

Jour 1

Rats témoins : Z = 6, P = 0.0003 ou P $<$ 0.01, l'hypothèse H_0 est rejetée, le choix peut être considéré comme étant un "choix raisonné".
Rats traités au PhB : Z = 2, P = 0.2548 ou P $>$ 0.01, l'hypothèse H_0 est acceptée, le choix ne peut pas être considéré comme étant un "choix raisonné".

Jour 2

Rats témoins : Z = 5, P = 0.002 ou P $<$ 0.01, l'hypothèse H_0 est rejetée, le choix peut être considéré comme étant un "choix raisonné".
Rats traités au PhB : Z = 3, P = 0.069 ou P $>$ 0.01, l'hypothèse H_0 est acceptée, le choix ne peut pas être considéré comme étant un "choix raisonné".

Jour 3

Rats témoins : Z = 8, "choix raisonné".
Rats traités au PhB : Z = 7, "choix raisonné".

Jour 4

Rats témoins : Z = 8, "choix raisonné".
Rats traités au PhB : Z = 11, "choix raisonné"

Jour 5

Rats témoins : Z = 13, "choix raisonné".
Rats traités au PhB : Z= 10, "choix raisonné".

RESUME

CONCLUSION

PERSPECTIVES

Le PhB est couramment utilisé en clinique, en particulier en médecine néonatale dans le traitement et la prophylaxie des crises convulsives chez le nouveau-né et parfois pendant des périodes prolongées. Afin d'étudier les effets d'une exposition chronique précoce au PhB sur la maturation biochimique du cerveau en développement, les jeunes rats ont été traités du 2e au 35e jour de vie postnatale à la dose de 50 mg/kg/j. La durée d'administration du médicament a été choisie car elle correspond à la période principale de la maturation cérébrale du rat. Cette étude nous a permis d'arriver aux conclusions suivantes :

Une administration chronique précoce de PhB chez le rat induit à court terme une diminution de la conversion du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux et une augmentation simultanée de l'utilisation du ßHB en tant que précurseur de la biosynthèse de ces acides aminés. Cependant, un tel traitement n'a que peu de conséquences sur les concentrations tissulaires des acides aminés dans le cerveau en développement.

L'augmentation de l'utilisation du ßHB par le cerveau des animaux traités au PhB est certainement en grande partie le reflet des taux circulants de composés cétoniques plus élevés chez ces animaux que chez les témoins.

Dans cette étude, il est apparu que le cerveau en développement était capable de modifier l'équilibre de sa balance énergétique ; en effet, le PhB induit un déséquilibre dans les taux relatifs d'utilisation des deux principaux substrats du métabolisme énergétique cérébral laissant le cerveau dans un état d'immaturité métabolique prolongé.

La question qui se pose est de savoir si un tel déséquilibre n'est pas préjudiciable au développement ultérieur du cerveau et ne pourrait pas contribuer à des altérations plus ou moins permanentes de la fonction cérébrale. Patel (1979) suggère que des perturbations de l'utilisation relative du glucose et/ou des composés cétoniques dans le

cerveau immature pourraient être en grande partie à l'origine de déficits à long terme observés après des agressions précoces comme la sous-alimentation et l'hypothyroidisme néonatal.

Les résultats obtenus dans cette étude ne permettent pas d'émettre une hypothèse sur le site d'action du PhB sur la régulation du métabolisme énergétique cérébral. Il semble probable que l'augmentation des concentrations sanguines des composés cétoniques soit à l'origine de l'augmentation de l'utilisation du ßHB dans le cerveau des animaux traités au PhB par rapport aux témoins. La diminution de l'utilisation cérébrale de glucose pourrait en être la conséquence ; en effet, il est connu, aussi bien chez l'animal adulte que chez l'animal en développement, que l'utilisation cérébrale de glucose est inhibée par les composés cétoniques.

La mise au point chez le rat en développement de méthodes de mesure de l'utilisation cérébrale locale de glucose (UCLG) par autoradiographie quantitative a permis de montrer qu'une exposition précoce au PhB induit une dépression à court terme de l'utilisation de glucose dans l'ensemble des structures cérébrales étudiées à tous les stades du développement sauf à 17 jours. Ce stade représente certainement une période critique de la maturation cérébrale. En effet, à 17 jours, l'efficacité de la conversion du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux s'est accrue et l'utilisation du ßHB est encore très active. L'activité métabolique importante à cette période est sans doute le reflet de la croissance cellulaire et de la myélinisation intense et pourrait peut-être contribuer en partie à la sensibilité différente aux effets du PhB à 17 jours par rapport aux autres stades du développement. La réduction de l'UCLG au cours du développement postnatal induite par le PhB confirme la diminution de la conversion du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux chez les animaux traités au PhB par rapport aux témoins.

Par ailleurs, le PhB induit un retard de croissance corporelle et cérébrale qui s'accompagne d'une diminution de l'UCLG en particulier à 10 et 14 jours, période du développement correspondant à une phase de croissance rapide cérébrale et à l'acquisition de certaines grandes fonctions comme l'audition. Une administration précoce de PhB semble capable de retarder la maturation métabolique des structures impliquées dans le contrôle des fonctions dont l'acquisition est relativement précoce comme l'audition, alors que la maturation de la fonction visuelle qui est plus tardive semblerait moins sensible au plan métabolique aux effets du PhB.

Une administration précoce de PhB induit à long terme une diminution des taux d'UCLG dans un certain nombre de territoires cérébraux localisés dans différents systèmes et en particulier au niveau de l'hippocampe, du cervelet et des aires corticales, structures dont on a montré qu'elles étaient particulièrement sensibles au PhB.

De plus, il semble exister une bonne corrélation entre les études in vivo et in vitro des effets du PhB sur le métabolisme dans le cerveau immature. En effet, une exposition pendant trois jours au PhB diminue le prélèvement spécifique du 2-désoxyglucose-(^{3}H) dans les neurones d'embryons de rat en culture. La dépression du métabolisme du glucose s'accompagne d'une réduction du taux de synthèse protéique dans les neurones traités au PhB.

Dans notre étude, il est apparu également que les perturbations à court et à long terme du métabolisme énergétique cérébral induites par le PhB s'accompagnent de déficits à long terme de l'activité locomotrice et de l'apprentissage spatial en labyrinthe des animaux traités au PhB. L'hétérogénéité importante des résultats obtenus au cours des tests comportementaux dans le groupe des animaux traités au PhB peut être rapprochée de la variabilité importante des effets comportementaux de ce médicament chez des enfants au cours de traitement anticonvulsivant par le PhB.

Bien que la dépression à court terme de l'utilisation cérébrale de glucose dans l'ensemble des structures qui persiste chez l'animal adulte dans bon nombre de territoires cérébraux contribue certainement aux effets à long terme de ce médicament sur le comportement, il apparaît cependant difficile d'établir des corrélations entre les effets du PhB sur le comportement et sur les taux d'UCLG en particulier au niveau des couches cellulaires de l'hippocampe. Dans la littérature, des perturbations du comportement en labyrinthe ont pu être associées à des déficits cellulaires spécifiques au niveau de l'hippocampe, structure impliquée dans l'expression des ces comportements. Dans notre étude, il n'a pas été possible d'établir une relation entre les effets comportementaux, l'UCLG dans les différentes couches cellulaires de l'hippocampe et ce qui est connu dans la littérature des déficits cellulaires après une exposition précoce au PhB.

Les effets d'une administration chronique précoce d'agents anticonvulsivants sur la biochimie du cerveau immature ont été peu étudiés. Le travail présenté dans ce mémoire permet d'apporter des éclaircissements sur les conséquences à court et à long terme d'un tel traitement sur le métabolisme énergétique cérébral chez le rat en développement. Cependant, les résultats de cette étude posent de nombreuses questions quant au mode d'action du PhB sur la maturation du métabolisme énergétique cérébral et ses effets à long terme sur le comportement et plus généralement sur la fonction cérébrale. Ce travail ouvre ainsi de nouvelles perspectives de recherche dans ce domaine.

L'étude des effets du PhB sur l'activité des enzymes hépatiques et cérébrales conduisant à la formation et à l'utilisation du glucose et des composés cétoniques par le cerveau en développement :

Au niveau du foie, il existe trois sites principaux de la régulation de la cétogénèse qui sont : 1) la lipolyse du tissu adipeux conduisant à la formation d'acides gras libres à partir des triacylglycérols ; 2) la carnitine acyltransférase I qui permet le transfert des chaînes d'acyl-CoA du cytosol dans la mitochondrie, régule

l'équilibre entre les voie d'estérification et de la ß-oxydation et 3) l'acétyl-CoA peut donner lieu soit à la formation des composés cétoniques soit entrer dans le cycle de Krebs.

Le PhB par ses propriétés d'inducteur enzymatique pourrait augmenter l'activité des enzymes hépatiques conduisant à la formation des composés cétoniques. Il serait intéressant d'étudier l'activité des enzymes intervenant dans la lipolyse du tissu adipeux, la carnitine acyltransférase I ainsi que les enzymes de la ß-oxydation. Ces études pourrait permettre de localiser le site primaire d'action du PhB sur l'augmentation des taux circulants de ßHB et ACA observée chez les animaux traités au PhB en période postnatale.

De même, on peut se demander quelle peut être l'influence du PhB sur la glycogénolyse hépatique. L'induction éventuelle des enzymes de la formation des composés cétoniques dans le foie pourrait-elle être à l'origine d'un effet inhibiteur sur les enzymes de la dégradation du glycogène?

L'étude de l'activité des enzymes cérébrales impliquées dans le métabolisme des composés cétoniques pourrait apporter des informations sur les effets de ce médicament sur l'utilisation cérébrale de ßHB au cours du développement postnatal. Les trois enzymes de l'oxydation du ßHB pourraient être étudiés : la ß-hydroxybutyrate déshydrogénase, la 3-cétoacide-CoA transférase et l'acétoacétyl-CoA thiolase. D'autres part, quels sont les effets du PhB sur les enzymes de la glycolyse au niveau cérébral?

L'étude autoradiographique semi-quantitative de l'utilisation cérébrale locale de ß-hydroxybutyrate permettrait de compléter l'étude des effets d'une exposition précoce au PhB sur la maturation du métabolisme énergétique du cerveau en développement. En effet, dans notre étude, nous avons mis en évidence chez les animaux traités au PhB, un déséquilibre de la balance énergétique cérébrale qui se traduit par une augmentation de l'utilisation du ßHB en tant que précurseur de la biosynthèse des acides aminés cérébraux chez ces animaux par rapport aux

témoins. L'étude de l'utilisation cérébrale locale de ßHB nous permettrait de mettre en évidence les structures particulièrement affectées au plan métabolique par le PhB et de répondre à plusieurs questions :

-la diminution de l'UCLG est-elle compensée par une utilisation accrue du ßHB comme le suggèrent nos études concernant la biosynthèse des acides aminés, et ceci dans toutes les structures présentant une baisse du l'UCLG?

-A 17 jours, alors que les taux d'UCLG ne sont pas affectés par le PhB, que se passe t-il quant à l'utilisation cérébrale locale de ßHB chez les animaux traités au PhB?

L'étude autoradiographique quantitative du débit sanguin cérébral local (DSCL). L'étude des effets du PhB sur l'UCLG chez le rat au cours du développement postnatal a permis de montrer une dépression importante de l'utilisation cérébrale de glucose chez les animaux traités par rapport aux témoins ainsi qu'un retard au plan métabolique de la maturation de certaines structures cérébrales. L'étude des effets du PhB sur le DSCL pourrait permettre d'apporter des informations sur les effets de ce médicament sur l'évolution du couplage entre le débit et le métabolisme cérébral au cours du développement et en particulier au stade de 17 jours. En effet, chez le rat témoin, il existe un découplage transitoire entre ces deux paramètres de l'activité fonctionnelle cérébrale uniquement à 17 jours, alors qu'ils restent couplés aux autres stades du développement. De plus, dans notre étude, nous avons montré que le PhB induit une dépression à court terme de l'UCLG dans l'ensemble des structures étudiées sauf à 17 jours, stade auquel aucune différence significative entre les deux groupes d'animaux n'a été observée.

Les comptages cellulaires pourraient nous renseigner sur les déficits réels du nombre des neurones, en particulier au niveau de structures particulièrement sensibles comme le cervelet, l'hippocampe et le cortex cérébral. Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de déficits à long terme de l'UCLG dans les différentes couches cellulaires du cervelet et de l'hippocampe des animaux traités au PhB en période postnatale par rapport aux témoins. Cependant, des études

neuromorphologiques chez la souris adulte ont permis de montrer des déficits cellulaires importants pouvant atteindre jusqu'à 35 % au niveau du cervelet et de l'hippocampe d'animaux traités précocement au PhB à la dose utilisée dans notre étude chez le rat.

La question qui se pose est de savoir si le cerveau immature est capable de compenser au plan métabolique des déficits éventuels du nombre des cellules cérébrales. Chez le rat, peu d'études neuromorphologiques concernant les effets du PhB ont été réalisées et cette étude pourrait apporter des renseignements importants sur la neurotoxicité de ce médicament dans cette espèce animale.

L'étude des effets du PhB à des doses différentes ainsi que l'étude comparative d'autres agents anticonvulsivants également couramment utilisés en clinique comme les benzodiazépines ou la diphénylhydantoine pourraient apporter des informations intéressantes sur le mode d'action de ces différents agents anticonvulsivants et sur la toxicité relative de chacun de ces médicaments.

BIBLIOGRAPHIE

ADLARD B.P.F., DOBBING J., (1971), Phosphofructokinase and fumarate hydratase in developing rat brain. J. Neurochem., 18 : 1299-1303.

AGRAWAL H.C., DAVIS J.M., HIMWICH W.A., (1966), Postnatal changes in free amino acid pool of rat brain. J. Neurochem., 13 : 607-615.

AGRAWAL H., DAVISON A.N., (1973), Myelination and amino acid imbalance in the developing brain. In : Biochemistry of the Developing Brain, Himwich W.A., Ed., Dekker, New York, vol. 1, pp. 143-186.

AHMED Z., WALKER P.S., FELLOWS R.E., (1983), Properties of neurons from dissociated fetal rat brain in serum-free culture. J. Neurosci., 12 : 2448-2462.

ALBRIGHT P.S., BURNHAM W.M., (1980), Development of a new pharmacological seizure model : effects of anticonvulsants on cortical and amygdale-kindled seizures in the rat. Epilepsia, 21 : 681-689.

ALLAN A.M., HARRIS R.A., (1986), Anesthetic and convulsant barbiturates alter γ-aminobutyric acid-stimulated chloride flux across brain membranes. J. Pharmacol. Exp. Ther., 238 : 763-768.

ALLING C., (1985), Biochemical maturation of the brain and the concept of vulnerable periods. In : Alcohol and the Developing Brain, Rydberg U. et Coll., Eds., Raven Press, New York, pp. 5-10.

AOKI K., KUROIWA Y., (1982), Effect of acute and chronic phenobarbital treatment on GABA and other amino acids contents in seven regions of the rat brain. J. Pharm. Dyn., 5 : 88-96.

ARMITAGE S.G., (1952), The effects of barbiturates on the behavior of rat offspring as measured in learning and reasoning situations. J. Comp. Physiol. Psychol., 45 : 146-152.

BACHELARD H.S., (1971), Specificity and kinetic properties of monosaccharide uptake into guinea pig cerebral cortex in vitro. J. Neurochem., 18 : 213-222.

BACHELARD H.S., (1980), Glucose transport to the brain in vivo and in vitro. In : Cerebral Metabolism and Neural Function, Passonneau J.V., Hawkins R.A., Lust W.D., Welsh F.A., Eds., Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 106-119.

BACHELARD H.S., CLARK A.G., THOMPSON M.F., (1971), Cerebral cortex hexokinases. Elucidation of reaction mechanisms by substrate and dead-end inhibitor kinetic analysis. Biochem. J., 123 : 707-715.

BALAZS R., (1971), Biochemical effects of thyroid hormones in the developing brain. In : Cellular Aspects of Neural Growth and Differentiation, UCLA Forum in Medical Science, n° 14, Pease D.C., Ed., University of California Press, Los Angeles, pp. 273-311.

BALAZS R., (1972), Effects of hormones and nutrition on brain development. In : Human Development and the Thyroid Gland, Stanberg J.B., Kroc R.L. Eds., Plenum Press, New York, pp. 385-415.

BALAZS R., COCKS W.A., EAYRS J.T., KOVACS S., (1971), Biochemical effects of thyroid hormones on brain. In : Hormones in Development, Hamburgh M., Barrington E.J.W., Eds., Appleton-Century-Croft, New York, pp. 357-379.

BANKER G.A., COWAN W.M., (1977), Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. Brain Res., 126 : 397-425.

BARNES C.D., ELTHERINGTON L.G., (1973), Drug Dosage in Laboratory Animals, A Handbook, University of California Press, Berkeley, 2nd edn.

BARRACLOUGH C.A., COLLU R., MASSA R., MARTINI L., (1971), Temporal interrelationship between plasma LH, ovarian secretion rates and peripheral plasma progestin concentration in the rat : effect of nembutal and exogenous gonadotrophin. Endocrinology, 88 : 1437-1444.

BAYER S.A., BRUNNER R.L., HINE R., ALTMAN J., (1973), Behavorial effects of interference with the postnatal acquisition of hippocampal granule cells. Nature New Biology, 242 : 222-224.

BAYER S.M., McMURRAY W.C., (1967), The metabolism of amino acids in developing rat brain. J. Neurochem., 14 : 695-706.

BEHRMAN R.E., VAUGHAN V.C., (1987), In : Nelson Textbook of Pediatrics, 13th Edn, W.B. Saunders Co, Philadelphia.

BENITO M., WHITELAW E., WILLIAMSON D.H., (1979), Regulation of ketogenesis during the suckling-weanling transition in the rat. Studies with isolated hepatocytes. Biochem. J., 180 : 137-144.

BERGEY G.K., SWAIMAN K.F., SCHRIER B.K., FITZGERALD S., NELSON P.G., (1981), Adverse effects of phenobarbital on morphological and biochemical development of fetal mouse spinal cord neurons in culture. Ann. Neurol., 9 : 584-589.

BERGMAN A., FEIGENBAUM J.J., YANAI J., (1982), Neuronal losses in mice following both prenatal and neonatal exposure to phenobarbital. Acta Anat., 114 : 185-192.

BERGMAN A., ROSSELLI-AUSTIN L., YEDWAB G., YANAI J., (1980), Neuronal deficits in mice following phenobarbital exposure during various periods in fetal development. Acta Anat., 108 : 370-373.

BJORKLUND A., STENEVI V., (1984), Intracerebral neural implants : neuronal replacement and reconstruction of damaged circuitries. Ann. Rev. Neurosci., 7 : 279-308.

BJORNTORP P., (1966), Effect of ketone bodies on lipolysis in adipose tissue in vitro. J. Lipid Res., 7 : 621-626.

BLAUSTEIN M.P., ECTOR A.C., (1975), Inhibition of calcium uptake by depolarized nerve in vitro. Mol. Pharmacol., 11 : 369-378.

BOOHER J., SENSENBRENNER M., (1972), Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. Neurobiology, 2 : 97-105.

BOOKER H.E., (1982), Phenobarbital relation of plasma concentration to seizure control. In : Antiepileptic Drugs, Woodbury D.M., Penry J.K., Pippenger C.E., Eds., Raven Press, New York, pp. 341-350.

BOOTH R.F.G., PATEL T.B., CLARK J.B., (1980), The development of enzymes of energy metabolism in the brain of a precocial (guinea pig) and non-precocial (rat) species. J. Neurochem., 34 : 17-25.

BORG J., SPITZ B., HAMEL G., MARK J., (1985), Selective culture of neurons from rat cerebral cortex : morphological characterization, glutamate uptake and related enzymes during maturation in various culture media. Dev. Brain Res., 18 : 37-49.

BORNSTEIN M.B., MODEL P.G., (1972), Development of synapses and myelin in cultures of dissociated embryonic mouse spinal cord, medulla and cerebrum. Brain Res., 37 : 287-293.

BOTTENSTEIN J., (1985), Growth and differentiation of neural cells in defined media. In : Cell Culture in the Neurosciences. Bottenstein J., Sato G., Eds., Plenum Press, New York, pp. 3-43.

BOTTENSTEIN J., SATO G., (1979), Growth of a neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 : 514-517.

BOTTENSTEIN J., SKAPER S., VARON S., SATO G., (1980), Selective survival of neurons in chick sensory ganglionic cultures utilizing serum-free supplemented medium. Exp. Cell Res., 125 : 183-190.

BRUNNER E.A., PASSONNEAU J.V., MOLSTAD C., (1971), The effect of volatile anaesthetics on levels of metabolites and on metabolic rate in brain. J. Neurochem., 18 : 2301-2316.

BUSCH H., FUJIWARA E., KEER L.M., (1960), Metabolic patterns for glucose-1-C14 in tissues of tumor-bearing rats. Cancer. Res., 20 : 50-57.

BUTLER H., JUURLINK B.H.J., (1984), An Atlas for Staging Mammalian and Chick Embryos, CRS Press, Boca Raton.

CAMFIELD C.S., CHAPLIN S., DOYLE A.B., SHAPIRO S.H., CUMMINGS C., CAMFIELD P.R., (1979), Side-effects of phenobarbital in toddlers : behavioral and cognitive aspects. J. Pediatr., 95 : 361-365.

CARNEY CRANE S., MORGAN B.L.G., (1983), Brain ß-hydroxybutyrate utilization in neonatal hypothyroidism in rats. Biol. Neonate, 43 : 234-244.

CATZ C., YAFFE S.J., (1968), Barbiturate enhancement of bilirubin conjugaison and excretion in young and adult animals. Pediatr. Res. 2 : 361-370.

CAVANAUGH M.W., (1955), Neuron development from trypsin-dissociated cells of differentiated spinal cord of the chick embryo. Exp. Cell Res., 9 : 42-48.

CHAPMAN A.G., NORDSTROM C.H., SIESJO B.K., (1978), Influence of phenobarbital anesthesia on carbohydrate and amino acid metabolism in rat brain. Anesthesiology, 48 : 175-182.

CHECK D.B., (1975), Fetal and Postnatal Cellular Growth, Wiley Biomedical Health Publications, New York, p. 523.

COCKS J.A., BALAZS R., JOHNSON A.L., EAYRS J.T., (1970), Effect of thyroid hormone on the biochemical maturation of rat brain : conversion of glucose-carbon into amino acids. J. Neurochem., 17 : 1275-1285.

COHEN P.J., ALEXANDER S.C., SMITH T.C., WOLLMAN H., (1967), Effects of hypoxia and normocarbia on cerebral blood flow and metabolism in conscious man. J. Appl. Physiol., 23 : 183-189.

COLE R.A., MARGORIS S., (1974), Stimulation of ketogenesis by dibutyryl-cyclic AMP in isolated rat hepatocytes. Endocrinology, 94 : 1391-1396.

COMMITTEE ON DRUGS, (1985), Behavioral and cognitive effects of anticonvulsant therapy. Pediatrics, 76 : 644-647.

CREMER J.E., (1971), Incorporation of label from D-ß-hydroxyl-(^{14}C)butyrate and (3-^{14}C)acetoacetate into amino acids in rat brain in vivo. Biochem. J., 122 : 135-138.

CREMER J.E., BRAUN L.D., OLDENDORF W.H., (1976), Changes during development in transport processes of the blood-brain barrier. Biochem. Biophys. Acta, 448 : 633-637.

CREMER J.E., HEATH D.F., (1974), The estimation of rates of utilization of glucose and ketone bodies in the brain of the suckling rat using compartmental analysis of isotopic data. Biochem. J., 142 : 527-544.

CREMER J.E., TEAL H.M., (1974), The activity of pyruvate dehydrogenase in rat brain during postnatal development. FEBS Lett., 39 : 17-20.

CROWLEY D.E., HEPP-REYMOND M.C., (1966), Development of cochlear function in the ear of the infant rat. J. Comp. Psychol., 62 : 427-432.

CULVER B., VERNADAKIS A., (1979), Effects of anticonvulsivant drugs on chick embryonic neurons and glia in cell culture. Dev. Neurosci., 2 : 74-85.

DAHLQUIST G., PERSSON B., (1976), Effect of intrauterine growth retardation on the postnatal development of D-ß-hydroxybutyrate dehydrogenase activity in rat brain. Biol. Neonate, 28 : 353-364.

DAHLQUIST G., PERSSON U., PERSSON B., (1972), The activity of D-ß-hydroxybutyrate dehydrogenase in fetal infant and adult rat brain and the influence of starvation. Biol. Neonate, 20 : 40-52.

DANIEL P.M., LOVE E.R., MOOREHOUSE S.R., PRATT O.E., WILSON P., (1971), Factors influencing utilization of ketone-bodies by brain in normal rats and rats with ketoacidosis. Lancet, 2 : 637-638.

DAVISON A.N., DOBBING J., (1966), Myelination as a vulnerable period in brain development. Br. Med. Bull., 22(1) : 40-44.

DAVISON A.N., DOBBING J., (1968), The developing brain. In : Applied Neurochemistry, Davison A.N., Dobbing J., Eds., Blackwell, Oxford, pp. 253.

DEAJURIAGUERRA J., MARCELLI O., (1989), In : Psychopathologie de l'Enfant, 3e Edn., Masson, Paris.

DeVIVO D.C., LECKIE M.P., AGRAWAL H.C., (1973), The differential incorporation of ß-hydroxybutyrate and glucose into brain glutamate in the newborn rat. Brain Res., 55 : 485-490.

DeVIVO D.C., LECKIE M.P., AGRAWAL H.C., (1975), D-ß-hydroxybutyrate : a major precursor of amino acids in developing rat brain. J. Neurochem., 25 : 161-170.

DEZA L., EIDELBERG E., (1967), Development of cortical electrical activity in the rat. Exp. Neurol., 17 : 425-438.

DIAZ J., (1983), Disruption of the brain growth spurt in adolescent rats by chronic phenobarbital administration. Exp. Neurol., 79 : 559-563.

DIAZ J., SCHAIN R.J., (1977), Chronic phenobarbital administration : effects upon brain growth and behavior of artificially reared rats. Proc. West Pharmacol. Soc., 20 : 153-157.

DIAZ J., SCHAIN R.J., (1978), Phenobarbital : effects of long term administration on behavior and brain of artificially reared rats. Science, 199 : 90-91.

DIAZ J., SCHAIN R.J., BAILEY B.G., (1977), Phenobarbital induced brain growth retardation in artificially reared rat pups. Biol. Neonate, 32 : 77-82.

DICHTER M.A., (1978), Rat cortical neurons in cell culture : culture methods, cell morphology, electrophysiology and synapse formation. Brain Res., 149 : 279-293.

DOBBING J., (1968), Vulnerable periods in developing brain. In : Applied Neurochemistry, Davison A.N., Dobbing J., Eds., Blackwell, Oxford, pp. 287-316.

DOBBING J., (1970), Vulnerable period in developing brain. In : Applied Neurochemistry, Davidson A.N. and Dobbing J., Eds., Davis, Philadelphia pp. 287-316.

DOBBING J., (1971), Undernutrition and the developing brain : the use of animal models to elucidate the human problem. Psychiat. Neurol. Neurochir., 74 : 433-442.

DOBBING J., PATH M.R.C., (1974), The later growth of the brain and its vulnerability. Pediatrics, 53 : 2-6.

DOBBING J., SANDS J., (1970), Growth and development of the brain and spinal cord of the guinea pig. Brain Res., 17 : 115-123.

DOBBING J., SANDS J., (1973), Quantitative growth and development of human brain. Arch. Dis. Child., 48 : 757-767.

DODSON W.E., (1989), Medical treatment and pharmacology of antiepileptic drugs. Pediatr. Clin. North Amer., 36 : 421-433.

DOUGLAS R.J., (1966), Transposition novelty and limbic lesions. J. Comp. Physiol. Psychol., 62 : 354-357.

DOUGLAS R.J., (1975), The development of hippocampal function : implications for theory and therapy. In : The Hippocampus, Isaacson R.L., Pribram K.H., Eds., Plenum Press, New York, vol.2, pp. 327-361.

DOW K.E., RIOPELLE R.J., (1988), Differential effects of anticonvulsivants on developing neurons in vitro. Neurotoxicol., 9 : 97-104.

DRAHOTA Z., HAHN P., KLEINZELLER A., KOSTOLANSKA A., (1964), Acetoacetate formation by liver slices from adult and infant rats. Biochem. J., 93 : 61- 65.

DRAVID A.R., JILEK L., (1965), Influence of stagnant hypoxia (oligaemia) on some free amino acids in rat brain during ontogeny. J. Neurochem., 12 : 837-843.

DUBOIS J.D., DUSSAULT J.H., (1977), Ontogenesis of thyroid function in the neonatal rat. Thyroxine (T_4) and triiodothyronine (T_3) production rates. Endocrinology, 101 : 435-441.

DUSSAULT J.H., RUEL J., (1987), Thyroid hormones and brain development. Ann. Rev. Physiol., 49 : 321-334.

EAYRS J.T., (1955), The cerebral cortex of normal and hypothyroid rats. Acta Anat. (Basel), 25 : 160-183.

EAYRS J.T., GOODHEAD B., (1959), Postnatal development of the cerebral cortex in the rat. J. Anat., 93 : 385-402.

EAYRS J.T., TAYLOR S.H., (1951), The effect of thyroid deficiency induced by methylthiouracil on the maturation of the central nervous system. J. Anat. (London), 85 : 356-358.

ECKERMAN D.A., GORDON W.A., EDWARDS J.D., MACPHAIL R.C., GAGE M.I., (1980), Effects of scopolamine, pentobarbital and amphetamine on radial arm maze performance in the rat. Pharmac. Biochem. Behav., 12 : 595-602.

EDMOND J., ROBBINS R.A., BERGSTROM J.D., COLE R.A., De VELLIS J., (1987), Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture. J. Neurosci. Res., 18 : 551-561.

ESCRIVA F., RODRIGUEZ C., PASCUAL-LEONE A.M., (1985), Glycemia, ketonemia and brain enzymes of ketone body utilization in suckling and adult rats undernourished from intrauterine life. J. Neurochem., 44 : 1358-1362.

FAINGOLD C.L., BROWNING R.A., (1987), Mechanisms of anticonvulsant drug action. I. Drugs primarily used for generalized tonic-clonic and partial epilepsies. Eur. J. Pediatr., 146 : 2-7.

FAZEKAS J.F., GRAVES F.B., ALMAN R.W., (1951), The influence of the thyroid on cerebral metabolism. Endocrinology, 48 : 169-174.

FERRARI M., BARABAS G., MATTHEWS W.S., (1983), Psychologic and behavioral disturbance among epileptic children treated with barbiturate anticonvulsants. Am. J. Psychiatr., 140 : 112-113.

FERRE P., PEGORIER J.P., WILLIAMSON D.H., GIRARD J.R., (1978), The development of ketogenesis at birth in the rat. Biochem. J., 176 : 759-765.

FISHMAN R.H.B., GAATHON A., YANAI J., (1982), Early barbiturate treatment eliminates peak serum thyroxine levels in neonatal mice and produces ultrastructural damage in the brains of adults. Dev. Brain Res., 5 : 202-205.

FLEXNER L.B., (1955), Enzymatic and functional patterns of the developing mammalian brain. In : Biochemistry of the Developing Nervous System, Waesch H., Ed., Academic Press, New York, pp. 281-295.

FONSECA N.M., SELL A.B., CARLINI E.A., (1976), Differential behavioral responses of male and female adult rats treated with five psychotropic drugs in the neonatal stage. Psychopharmacologia, 46 : 263-268.

FONNUM F., (1984), Glutamate : a neurotransmitter in mammalian brain. J. Neurochem., 42 : 1-11.

FOSTER P.C., BAILEY E., (1976), Changes in the activities of the enzymes of hepatic fatty acid oxidation during development of the rat. Biochem. J., 154 : 49-56.

FREYGANG W.H., SOKOLOFF L., (1958), Quantitative measurement of regional circulation in the central nervous system by the use of radioactive inert gas. Adv. Biol. Med. Phys., 6 : 263-279.

GAITONDE M.K., DAHL D.R., ELLIOT K.A.C., (1965), Entry of glucose carbon into amino acids of rat brain and liver in vivo after injection of uniformly ^{14}C labelled glucose. Biochem. J., 94 : 345-352.

GAITONDE M.K., RICHTER D., (1966), Changes with age in the utilization of glucose carbon in liver and brain. J. Neurochem., 13 : 1309-1316.

GARCIA-ARGIZ C.A., PASQUINI J.M., KAPLUN B., GOMEZ C.J., (1967), Hormonal regulation of brain development. II. Effect of neonatal thyroidectomy on succinate dehydrogenase and other enzymes in developing cerebral cortex and cerebellum of the rat. Brain Res., 6 : 635-646.

GATFIELD P.D., LOWRY O.H., SCHULZ D.W., PASSONNEAU J.V., (1966), Regional energy reserves in mouse brain and changes with ischaemia and anaesthesia. J. Neurochem., 13 : 185-195.

GEEL S.E., TIMIRAS P.S., (1967), The influence of neonatal hypothyroidism and of thyroxine on the ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid concentrations of rat cerebral cortex. Brain Res., 4 : 135-142.

GHERSI-EGEA J.F., MINN A., SIEST G., (1987a), Changes of cerebral gamma glutamyltransferase activities after treatment with exogenous inducers. Neurochem. Res., 12 : 357-359.

GHERSI-EGEA J.F., WALTHER B, PERRIN R., MINN A., SIEST G., (1987b), Inducibility of rat brain drug-metabolizing enzymes. Eur. J. Drug Metabol. Pharmacokinet., 12 : 263-265.

GIRARD J., CUENDET G.S., MARLISS E.B., KERVRAN A., RIEUTORT M., ASSAN R., (1973), Fuels, hormones and liver metabolism at term during the early postnatal period in the rat. J. Clin. Invest., 52 : 3190-3200.

GIRARD J., FERRE P., (1982), Metabolic and hormonal changes around birth. In : Biochemical Development of the Fetus and Neonate, Jones C.T., Ed., Elsevier, Amsterdam, pp. 517-551.

GJEDDE A., (1982), Calculation of cerebral glucose phosphorylation from brain uptake of glucose analogs in vivo : a re-examination. Brain Res. Rev., 4 : 237-274.

GJEDDE A., CARONNA J.J., HINDFELT B., PLUM F., (1975), Whole brain blood flow and oxygen metabolism in the rat during nitrous oxide anesthesia. Am. J. Physiol., 229 : 113-118.

GJEDDE A., CRONE C., (1975), Induction processes in blood-brain transfer of ketone bodies during starvation. Am. J. Physiol., 229 : 1165-1169.

GJEDDE A., RASMUSSEN M., (1980), Pentobarbital anesthesia reduces blood-brain glucose transfer in the rat. J. Neurochem., 35 : 1382-1387.

GOLDWITZ D., KOCH J., (1986), Performance of normal and neurological mutant mice on radial arm maze and active avoidance tasks. Behav. Neurol. Biol., 46 : 216-226.

GUPTA C., KARAVOLAS H.J., (1973), Lowered ovarian conversion of ^{14}C-pregnenolone to progesterone and other metabolites during phenobarbital block of PMS-induced ovulation in immature rats. Endocrinology, 92 : 117-124.

GUPTA G., SHAPIRO B.H., YAFFE S.J., (1980a), Reproductive dysfunction in male rats following prenatal exposure to phenobarbital. Pediatr. Pharmacol., 1 : 55-62.

GUPTA G., SONAWANE B.R., YAFFE S.J., SHAPIRO B.H., (1980b), Phenobarbital exposure in utero : alterations in female reproductive function in rats. Science, 208 : 508-510.

GUPTA C., YAFFE S.J., SHAPIRO B.H., (1982), Prenatal exposure to phenobarbital permanently decreases testosterone and causes reproductive dysfunction. Science, 216 : 640-641.

HALES C.N., LUZIO J.P., SIDDLE K., (1978), Hormonal control of adipose tissue lipolysis. Biochem. Soc. Symp., 43 : 97-135.

HAMBURGH M., FLEXNER L.B., (1957), Biochemical and physiological differentiation during morphogenesis. XXI. Effect of hypothyroidism and hormone therapy on enzyme activities of the developing cerebral cortex of the rat. J. Neurochem., 1 : 279-288.

HAMBURGH M., VICARI E., (1957), Effect of thyroid hormone on nervous system maturation. Anat. Res., 127 : 302-311.

HANNAH R.S., ROTH S.H., SPIRA A.W., (1982), The effect of chlorpromazine and phenobarbital on cerebellar Purkinje cells. Teratology, 26 : 21-25.

HANNAH R.S., ROTH S.H., SPIRA A.W., (1988), Effect of phenobarbital on Purkinje cell growth patterns in the rat cerebellum. Exp. Neurol., 100 : 354-364.

HANNAH R.S., SPIRA A.W., ROTH S.H., (1989), The effects of two anticonvulsants on amino acid levels in the developing rat cerebellum. Neurochem. Res., 14 : 427-429.

HARRIS R.A., CASE J., (1979), Effects of maternal consumption of ethanol, barbital or chlordiazepoxide on the behavior of the offspring. Behav. Neurol. Biol., 26 : 234-247.

HARRISON R.G., (1907), Observations on the living developing nerve fiber. Soc. Exp. Biol. Med. Proc., 241 : 140-150.

HAWKINS R.A., WILLIAMSON D.H., KREBS H.A., (1971), Ketone body utilization by adult and suckling rat brain in vivo. Biochem. J., 122 : 13-18.

HEIMBERG M., WEINSTEIN I., KOHOUT M., (1969), The effects of glucagon, dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and concentration of free fatty acid on hepatic lipid metabolism. J. Biol. Chem., 244 : 5131-5139.

HENN F.A., (1980), In : Advances in Cellular Neurobiology . Federoff S., Hertz L., Eds., Academic Press, New York, Vol.1, pp. 373-403.

HERS H.G., DeDUVE C., (1950), Le système hexose-phosphatasique II. Répartition de l'activité glucose-6-phosphatasique dans les tissus. Bull. Soc. Chim. Biol., 32 : 20-29.

HERTZ L., CHABAN G., (1982), Cell cultures. In : Neuroscience Approached Through Cell Culture, Pfeiffer S.E., Ed., CRC Press, Boca Raton, vol. 1, pp. 157-174.

HERTZ L., JUURLINK B.H.J., SZUCHET S., (1985), Cell cultures. In : Handbook of Neurochemistry, Lajtha A., Ed., Plenum Publishing Corporation, Vol. 8, pp. 603-661.

HEYER E.J., MACDONALD R.L., (1982), Barbiturate reduction of calcium dependent action potentials : correlation with anesthetic action. Brain Res., 236 : 157-171.

HIMWICH H.E., (1951), Brain Metabolism and Cerebral Disorders, Williams & Wilkins, Baltimore.

HIMWICH W.A., PETERSEN J.C., (1959), Correlation of chemical maturation of the brain in various species with neurologic behavior. In : Biological Psychiatry, Masserman J.H., Ed., Grune and Stratton, New York, Vol. 1, pp. 2-16.

HO I.K., HARRIS R.A., (1981), Mechanism of action of barbiturates. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 21 : 83-111.

HOFFMAN D.W., ZAMIR N., (1894), Localization and quantitation of dynorpin B in the rat hippocampus. Brain Res., 324 : 354-357.

HORTON R.W., MELDRUM B.S., BACHELARD H.S., (1973), Enzymic and cerebral metabolic effects of 2-deoxy-D-glucose. J. Neurochem., 21 : 507-520.

HORTON R.W., (1974), The kinetics of glucose influx into the mouse brain in vivo and the effects of pentobarbitone anaesthesia and hypothermia. Biochem. Soc. Trans., 2 : 293-294.

HOSTETLER K.Y., LANDAU B.R., WHITE R.J., ALBIN M.S., YASHON D., (1970), Contribution of the pentose cycle to the metabolism of glucose in the isolated, perfused brain of the monkey. J. Neurochem., 17 : 33-39.

IOANNIDES C., PARKE D.V., (1975), Mechanism of induction of hepatic microsomal drug metabolizing enzymes by a series of barbiturates. J. Pharm. Pharmac., 27 : 739-746.

ISAACSON R.L., (1982), The Limbic System, Plenum Press, New York.

ISER-STRENGER C., YANAI J., (1986), Alterations in mice dopamine receptor characteristics after early exposure to phenobarbital. Dev. Brain Res., 30 : 57-65.

ISSEROFF A., (1979), Limited recovery of spontaneous alternation after extensive hippocampal damage : evidence for a memory impairment. Exp. Neurol., 64 : 284-294.

ITOH T., QUASTEL J.H., (1970), Acetoacetate metabolism in infant and adult rat brain in vitro. Biochem. J., 116 : 641-655.

JACKSON W.J., STRONG P.J., (1969), Differential effects of hippocampal lesions upon sequential tasks and maze learning by the rat. J. Comp. Physiol. Psychol., 68 : 442-450.

JACOBSON C.D., ANTOLICK L.L., SCHOLEY R., VEMURA E., (1988), The influence of prenatal phenobarbital exposure on the growth of dendrites in the rat hippocampus. Dev. Brain Res., 44 : 233-239.

JACOBSON M., (1978), Developmental Neurobiology, Plenum Press, New York.

JONES C.L., WOODBURY D.M., (1976), Effects of diphenylhydantoin and phenobarbital on protein metabolism in the rat cerebral cortex. Biochem. Pharmacol., 25 : 53-61.

JURASKA J.M., FIFKOVA E., (1979), An electron microscope study of the early postnatal development of the visual cortex of hooded rat. J. Comp. Neurol., 183 : 257-267.

KANDERA J., LEVI G., LAJTHA A., (1968), Control of cerebral metabolite levels. II. Amino acid uptake and levels in various areas of the rat brain. Arch. Biochem., 126 : 249-260.

KANEYUKI T., MATSUTOSHI K., SHAHMORI T., (1979), Sex hormone metabolism in the brain : influence of central action drugs on 5 reduction in rat diencephalon. Endocrinol. Jpn., 26 : 345-351.

KELLY P.M., SEVIDUR P.W., IVERSEN S.D., (1975), Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. Brain Res., 94 : 507-522.

KETY S.S., (1950), Circulation and metabolism of the human brain in health and disease. Am. J. Med., 8 : 205-217.

KETY S.S., (1957), The general metabolism of the brain in vivo. In : Metabolism of the Nervous System, Richter D., Ed., Pergamon Press, London, pp. 221-237.

KETY S.S., (1960), Measurement of local blood flow by the exchange of an inert, diffusible substance. Methods Med. Res., 8 : 228-236.

KETY S.S., SCHMIDT C.F., (1948), The nitrous oxide method for the quantitative determination of cerebral blood flow in man : theory, procedure, and normal values. J. Clin. Invest., 27 : 476-483.

KIMBLE D.P., (1976), Changes in behavior of hippocampal-lesioned rat across a 6-week postoperative period. Physiol. Psychol., 4 : 289-293.

KIRK R.E., (1968), Experimental Design : Procedures for the Behavioral Sciences, Brooks/Cole, Belmont, CA.

KLAUSNER H.J., SOLER ARGILAGA C., HEIMBERG M., (1978), Effects of dibutyryladenosine 3',5'-monophosphate on hepatic metabolism of free fatty acids. Metabolism, 27 : 13-25.

KLEE C.B., SOKOLOFF L., (1967), Changes in D(-)-ß-hydroxybutyric dehydrogenase activity during brain maturation in the rat. J. Biol. Chem., 242 : 3880-3883.

KLEINBERGER N., YANAI J., (1985), Early phenobarbital-induced alterations in hippocampal acetylcholinesterase activity and behavior. Dev. Brain Res., 22 : 113-123.

KOLB B., SUTHERLAND R.J., WHISHAW I.Q., (1983), A comparison of the contributions of the frontal cortex and parietal association cortex to spatial localization in rats. Behav. Neurosci., 9 : 13-27.

KRAUS H., SCHLENKER S., SCHWEDESKY D., (1974), Developmental changes of cerebral ketone body utilization in human infants. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 355 : 164-170.

KREBS H.A., WILLIAMSON D.H., BATES M.W., PAGE M.A., HAWKINS R.A., (1971), The role of ketone bodies in caloric homeostasis. Adv. Enzyme Regul., 9 : 387-409.

KUHLMANN K., ODUAH M., COPER H., (1970), Uber die wirkung von barbituraten by Ratten verschiedenen alters. Arch. Pharmak., 265 : 310-320.

LABELLA F.S., (1981), Is there a general anesthesia receptor? Can. J. Physiol. Pharmacol., 59 : 432-442.

LAJTHA A.L., MAKER H.S., CLARKE D.D., (1981), Metabolism and transport of carbohydrates and amino acids. In : Basic Neurochemistry, 3rd Edn, Siegel G.J., Albers R.W., Agranoff B.W., Katzman R.K., Eds., Little & Brown, Boston, pp. 329-353.

LAND J.M., BOOTH R.F.G., BERGER R., CLARK J.B., (1977), Development of mitochondrial energy metabolism in rat brain. Biochem J., 164 : 339-348.

LANDAU W.M., FREYGANG W.H., ROWLAND L.P., SOKOLOFF L., KETY S.S., (1955), The local circulation of the living brain : values in the unanesthetized and anesthetized cat. Trans. Am. Neurol. Assoc., 80 : 125-129.

LASSEN N.A., (1959), Cerebral blood flow and oxygen consumption in man. Physiol. Rev., 39 : 183-238.

LASSEN N.A., MUNCK O., (1955), The cerebral blood flow in man determined by the use of radioactive krypton. Acta Physiol. Scand., 33 : 30-49

LEHOULLIER P.F., TICKU M.K., (1989), The pharmacological properties of GABA receptor-coupled chloride channels using ^{36}Cl-influx in cultured spinal cord neurons. Brain Res., 487 : 205-214.

LEONG S.F., CLARK J.B., (1984), Regional enzyme development in rat brain. Biochem. J., 218 : 131-138.

LETOURNEAU P.C., (1975), Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation. Develop. Biol., 44 : 92-101.

LOCKWOOD E.A., BAILEY E., (1970), Fatty acid utilization during development of the rat. Biochem. J., 120 : 49-54.

LOHSE M.J., LENSCHOW V., SCHWABE U., (1984), Interaction of barbiturates with adenosine receptor's in rat brain. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 326 : 67-74.

LOW W.C., LEWIS P.R., BUNCH S.T., DUNNET S.B., THOMAS R., IVERSEN S.D., BJORKLUND A.B., STENEVI V., (1982), Function recovery following neural transplantation of embryonic septal nuclei in adult rats with septohippocampal lesions. Nature, 300 : 260-262.

MACDONALD R.L., (1983), Mechanisms of anticonvulsant drug action. In : Recent Advances in Epilepsy, Pedly T.A., Meldrum B., Eds., Churchill, Edinburgh, Vol. 1, pp. 1-23.

MACDONALD R.L., (1984), Anticonvulsant and convulsant drug actions on vertebrate neurones in primary dissociated cell culture. In : Electrophysiology of Epilepsy, Schwartzkroin P.A., Wheal H.V., Eds., Academic Press, London, pp. 353-387.

MACDONALD R.L., MCLEAN M.J., (1982), Cellular bases of barbiturate and phenytoin anticonvulsant drug action. Epilepsia, 23 : S7-S18.

MACDONALD R.L., SKERRIT J.H., WERZ M.A., (1985), Barbiturate and benzodiazepine actions on mouse neurons in cell culture. In : Molecular and Cellular Mechanisms of Anesthesia, Roth S.H., Miller K.W., Eds., Plenum Press, New York, pp. 17-25.

MACLEOD C.M., DEKABAN A.S., HUNT E., (1978), Memory impairment in epileptic patients : selective effects of phenobarbitone concentration. Science, 202 : 1102-1104.

MACNEILL C., BRYAN R.M., (1988), Regional cerebral glucose utilization transiently increases during mild hypoxia. J. Cerebr. Blood Flow Metabol., 8 : 495-501.

MADISON L.L., MEBANE D., UNGER R.H., LOCHNER A., (1964), The hypoglycemic action of ketones. II. Evidence for a stimulatory feedback of ketones on the pancreatic beta cells. J. Clin. Invest., 43 : 408-415.

MAGNI S., KREKULE I., BURES J., (1979), Radial maze type as a determinant of the choice behavior of rats. J. Neurosci. Methods, 1 : 343-352.

MARTIN J.C., MARTIN D.C., LEMIRE R., MACKLER B., (1979), Effects of maternal absorption of phenobarbital upon rat offspring development and function. Neurobehav. Toxicol., 1 : 49-55.

MARTIN J.C., MARTIN D.C., MACKLER B., GRACE R., SHORES P., CHAO S., (1985), Maternal barbiturate administration and offspring response to shock. Psychopharmacol., 85 : 214-220.

MASUDA Y., UTSUI Y., SHIRAISHI Y., KARASAWA T., YOSHIDA K., SHIMIZU M., (1979), Relationship between plasma concentrations of diphenylhydantoin, phenobarbital, carbamazepine and 3-sulfamoylméthyl-1, 2-benzisoxazole (AD-810), a new anticonvulsant agent, and their anticonvulsant or neurotoxic effects in experimental animals. Epilepsia 20 : 623-633.

MATTSON R.H., CRAMER J.A., (1982), Phenobarbital toxicity. In : Antiepileptic Drugs, Woodbury D.M., Penry J.K., Pippenger C.E., Eds., Raven Press, New York, Chap. 26, pp. 351-363.

MAYMAN C.I., GATFIELD P.D., BRECKENRIDGE B., (1964), The glucose content of brain in anesthesia. J. Neurochem., 11 : 483-487.

MAYNERT E.W., (1982), Phenobarbital : absorption, distribution and excretion. In : Antiepileptic Drugs, Woodbury D.M., Penry J.K., Pippenger C.E., Eds., Raven Press, New York, pp. 309-317.

McBRIDE M.C., ROSMAN N.P., DAVIDSON S.J., OPPENHEIMER E.Y., (1985), Long term behavorial effects of phenobarbital in suckling rats. Exp. Neurol., 89 : 59-70.

McILWAIN H., (1971), Types of metabolic adaptation in the brain. Essays in Biochemistry, 7 : 127-158.

McILWAIN H., BACHELARD H.S., (1985), Biochemistry and the Central Nervous System, 5th Edn., Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 154-201.

MIDDAUGH L.D., (1986), Phenobarbital during pregnancy in mouse and man. Neurotoxicology, 7 : 287-302.

MIDDAUGH L.D., BLACKWELL A.B., BOGGAN W.O., ZEMP J.W., (1981c), Brain concentration of phenobarbital and behavioral activation or depression. Pharmacol. Biochem. Behav., 15 : 723-728.

MIDDAUGH L.D., SANTOS III C.A., ZEMP J.W., (1975), Effects of phenobarbital given to pregnant mice on behavior of mature offspring. Dev. Psychobiol., 8(4) : 305-313.

MIDDAUGH L.D., SIMPSON L.W., THOMAS T.N., ZEMP J.W., (1981a), Prenatal maternal phenobarbital increases reactivity and retards habituation of mature offspring to environmental stimuli. Psychopharmacology, 74 : 349-352.

MIDDAUGH L.D., THOMAS T.N., SIMPSON L.W., ZEMP J.W., (1981b), Effect of prenatal maternal injections of phenobarbital on brain neurotransmitters and behavior of young C57 mice. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 3 : 271-275.

MIDDLETON B., (1973), The acetoacetyl-coenzyme A thiolase of rat brain and their relative activities during postnatal development. Biochem. J., 132 : 731-737.

MILLER A.L., (1986), Regional glucose and ß-hydroxybutyrate use by developing rat brain. Metabol. Brain Dis., 1(1) : 53-61.

MILLER A.L., KINEY C.A., CORDDRY D.H., STATON D.M., (1982a), Interactions between glucose and ketone body use by developing brain. Dev. Brain Res., 4 : 443-450.

MILLER K.W., SAUTER J.F., BRASWELL L.M., (1982b), A stereoselective pentobarbital binding site in cholinergic membranes from Torpedo California. Biochem. Biophys. Res. Commun., 105 : 659-666.

MOHLER H.P., PATEL A.J., BALAZS R., (1975), Effect of 1-hydroxy-3-aminopyrrolidone-2 and other CNS depressant on metabolic compartmentation in the brain. In : Metabolic Compartmentation and Neurotransmission. Relation to Brain Structure and Function. Berl S., Clarke D.D., Schneider D., Eds., Plenum Press, New York, pp. 385-395.

MOORE J.J., LIONE A.P., REGEN D.M., TARPLEY H.L., RAINES P.L., (1971), Brain glucose metabolism in the newborn rat. Am. J. Physiol., 221 : 1746-1753.

MOORE T.J., LIONE A.P., SUGDEN M., REGEN D., (1976), ß-hydroxybutyrate transport in rat brain : developmental and dietary modulations. Am. J. Physiol., 230 : 619-630.

MOSCONA A., (1965), Cells and Tissues in Culture, Willmer N., Ed., Academic Press, New York, Vol.1, pp. 489-529.

MOUREK J., HIMWICH W.A., MYSLIVECEK J., CALLISON D., (1967), The role of nutrition in the development of evoked cortical responses in the rat. Brain Res., 6 : 241-251.

MURAI N., (1966), Effect of maternal medication during pregnancy upon behavioral development of offspring. Tohuku. J. Exp. Med., 89 : 265-272.

MURRAY M.R., (1965), Nervous tissues in vitro . In : Cells and Tissues in Vitro, Wilmer E.N., Ed., Academic Press, New Yok, pp. 373-455.

MYSLIVECEK J., (1970), Electrophysiology of the developing brain. Central and eastern european contributions. In : Developmental Neurobiology, Himwich W.A., Ed., Charles C. Thomas, Springfield, pp. 475-527.

NAKAI J., (1956), Dissociated dorsal root ganglia in tissue culture. Amer. J. Anat., 99 : 81-129.

NEALE E.A., SHER P.K., GRAUBARD B.I., HABIG W.H., FITZGERALD S.C., NELSON P.G., (1985), Differential toxicity of chronic exposure to phenytoin, phenobarbital or carbamazepine in cerebral cortical cell cultures. Pediat. Neurol., 1 : 143-150.

NEHLIG A., PEREIRA DE VASCONCELOS A., BOYET S., (1988a), Quantitative measurement of local cerebral glucose utilization in freely-moving rats during postnatal development. J. Neurosci., 8 : 2321-2333.

NEHLIG A., PEREIRA DE VASCONCELOS A., BOYET S., (1988b), Evolution postnatale de l'utilisation cérébrale locale de glucose chez le rat. Circ. Métabol. Cerveau, 5 : 72-87.

NEHLIG A., PEREIRA DE VASCONCELOS A., BOYET S., (1989a), Evolution du couplage entre le débit sanguin cérébral et l'utilisation cérébrale de glucose chez le rat au cours du développement postnatal. Circ. Métabol. Cerveau, 6 : 140-159.

NEHLIG A., PEREIRA DE VASCONCELOS A., BOYET S., (1989b), Postnatal changes in local cerebral blood flow measured by the quantitative autoradiographic [^{14}C]iodoantipyrine technique in freely moving rats. J. Cerebr. Blood Flow Metabol., 9 : 579-588.

NEHLIG A., PORRINO L.J., CRANE A.M., SOKOLOFF L., (1985), Local cerebral glucose utilization in normal female rats : variations during the estrus cycle and comparison with males. J. Cerebr. Blood Flow Metabol., 5 : 393-400.

NILSSON L., SIESJO B.K., (1974), Influence of anaesthetics on the balance between production and utilization of energy in the brain. J. Neurochem., 23 : 29-36.

NORDBERG A., WAHLSTROM G., (1984), Different interactions of steric isomers of hexobarbital to muscarinic agonist and antagonist binding sites in brain. Brain Res., 310 : 189-192.

NORTON W.T., PODUSLO S.E., (1973), Myelination in rat brain : changes in myelin composition during brain maturation. J. Neurochem., 21 : 759-773.

NUNEZ J., LENNON A.M., MARECK A., FRANCON J., FELLOUS A., (1980), Thyroid hormones and neurites growth during brain development. In : Radioimmuno-assay of Hormones, Proteins and Enzymes, Albertini A., Ed., Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 127-135.

OLSEN R.W., (1981), GABA-Benzodiazepines-Barbiturate receptor interactions. J. Neurochem., 37 :1-13.

OLSEN R.W., WONG E.H.F., STAUBER C.B., KING R.G., (1984), Biochemical pharmacology of the -aminobutyric acid receptor/ionophore protein. Fed. Proc., 43 :2773-2778.

OLTON D.S., (1979), The function of septo-hippocampal connections in spatially organized behavior. In : Functions of the Septo-Hippocampal System, Ciba Foundation Symposium, Elsevier, New York, pp. 327-349.

OLTON D.S., BRANCH M., BEST P.J., (1978), Spatial correlates of hyppocampal unit activity. Exp. Neurol., 58 : 587-609.

OLTON D.S., HANDELMANN G.E., WALKER J.A., (1981), A spatial memory and food searching strategies. In : Foraging Behavior : Ecological, Ethological and Psychological Approaches, Kamil A.C., Sargent T.D., Eds., Garland, New York.

OLTON D.S., SAMUELSON R.J., (1976), Remembrance of places passed : spatial memory in rats. J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Proc., 2 : 97-116.
ONDRUSEK M.G., BELKNAP J.K., LESLIE S.W., (1979), Effects of acute and chronic barbiturate administration on synaptosomal calcium accumulation. Mol. Pharmacol., 15 : 386-395.

ORZI F., LUCIGNANI G., DOW-EDWARDS D., NAMBA H., NEHLIG A., PATLAK C.S., PETTIGREW K., SCHUIER F., SOKOLOFF L., (1988), Local cerebral glucose utilization in controlled graded levels of hyperglycemie in the conscious rat. J. Cereb. Blood Flow Metabol., 8 : 346-356.

OWEN O.E., MORGAN A.P., KEMP H.G., SULLIVAN J.M., HERRERA M.G., CAHILL G.F., (1967), Brain metabolism during fasting. J. Clin. Invest., 46 : 1589-1595.

PAGE M.A., KREBS H.A., WILLIAMSON D.H., (1971), Activities of enzymes of ketone-body utilization in brain and other tissues of suckling rats. Biochem. J., 121 : 49-53.

PAGE M.A., WILLIAMSON D.H., (1971), Enzymes of ketone-body utilization in human brain. Lancet, 2 : 66-68.

PAINTER M., PIPPENGER C., MACDONALD H., PITLOCK W., (1978), Phenobarbital and diphenylhydantoin levels in neonates with seizures. J. Pediatr., 92 : 315-319.

PARDRIDGE W.M., (1983), Brain metabolism : a perspective from the blood brain barrier. J. Physiol. Rev., 63 : 1481-1535.

PARDRIDGE W.M., CRANE P.D., MIETUS L.J., OLDENDORF W.H., (1982), Kinetics of regional blood-brain barrier transport and brain phosphorylation of glucose and 2-deoxyglucose in the barbiturate anesthetized rat. J. Neurochem., 38 : 560-568

PASQUINI J.M., KAPLUN B., GARCIA ARGIZ C.A., GOMEZ C.J., (1967), Hormonal regulation of brain development. I. The effect of neonatal thyroidectomy upon nucleic acids, protein and two enzymes in developing cerebral cortex and cerebellum of the rat. Brain Res., 6 : 621-634.

PATEL A.J., BALAZS R., (1970), Manifestation of metabolic compartmentation during the maturation of the rat brain. J. Neurochem., 17 : 955-971.

PATEL A.J., BALAZS R., (1975), Factors affecting the development of metabolic compartmentation in the brain. In : Metabolic Compartmentation and Neurotransmission. Relation to Brain Structure and Function. Berl S., Clarke D.D., Schneider D., Eds., Plenum Press, New York, pp. 363-383.

PATEL M.S., (1979), Influence of neonatal hypothyroidism on the development of ketone-body-metabolizing enzymes in rat brain. Biochem. J., 184 : 169-172.

PATSALOS P.N., LASCELLES P.T., (1981), Changes in regional brain levels of amino acid putative neurotransmitters after prolonged treatment with the anticonvulsant drugs diphenylhydantoin, phenobarbitone, sodium valproate, ethosuximide and sulthiame in the rat. J. Neurochem., 36 : 688-695.

PATSALOS P.N., WIGGINS R.C., (1982), Brain maturation following administration of phenobarbital, phenytoin, and sodium valproate to developing rats or to their dams : effects on synthesis of brain myelin and other subcellular membrane proteins. J. Neurochem., 39 : 915-923.

PAXINOS G., WATSON C., (1982), The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic, New York.

PERCY V.A., SHANLEY B.C., (1979), Studies on haem biosynthesis in rat brain. J. Neurochem., 33 : 1267-1274.

PERLOW J.M., (1987), Brain grafting as a treatment for Parkinson's disease. Neurosurgery, 20 : 335-342.

PERSSON B., SETTERGREN G., DAHLQUIST G., (1972), Cerebral arterio-venous difference of acetoacetate and ß-hydroxybutyrate in children. Acta Paediatr. Scand., 61 : 273-278.

PETTIGREW K.D., SOKOLOFF L., PATLAK C.S., (1983), A theorical derivation of the lumped constant for the 2-deoxyglucose method for measuring local glucose metabolism in brain. J. Cereb. Blood Flow Metabol. 3 : S89-S90.

PETTMANN B., LOUIS J.C., SENSENBRENNER M., (1979), Morphological and biochemical maturation of neurones cultured in the absence of glial cells. Nature, 281 : 378-380.

PHILIPS M.E., COXON R.V., (1976), Effect of insulin and phenobarbital on uptake of 2-deoxyglucose by brain slices and hemidiaphragms. J. Neurochem., 27 : 643-645.

PICK C.G., YANAI J., (1984), Long term reduction in spontaneous alternations after early exposure to phenobarbital. Int. J. Dev. Neurosci., 2 : 223-228.

PICK C.G., YANAI J., (1985), Long term reduction in eight arm maze performance after early exposure to phenobarbital. Int. J. Dev. Neurosci., 3 : 223-227.

PINSKER H.M., FRENCH G.M., (1967), Indirect delayed reactions under various testing conditions in normal and midlateral frontal monkeys. Neuropsychologia, 4 : 13-24.

POLLAY M., STEVENS F.A., (1980), Starvation-induced changes in transport of ketone bodies accross the blood brain barrier. J. Neurosci. Res., 5 : 163-172.

RAGGI F., KRONFELD D.S., KLEIBER M., (1960), Glucose-6-phosphatase activity in various sheep tissues. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 105 : 485-486.

RAMANJANEYULU R., TICKU M.K., (1984), Binding characteristics and interactions of depressant drugs with [^{35}S]t-butylcyclophosphorothionate, a ligand that binds to the picrotoxinin site. J. Neurochem., 42 : 221-229.

RAMIREZ DE GUGLIELMONE A.E., GOMEZ C.J., (1966), Influence of neonatal hypothyroidism on amino acids in developing rat brain. J. Neurochem., 13 : 1017-1025.

RASKIN L.A., (1983), Differential effects of selective dopamine, norepinephrine or catecholamine depletion on activity and learning in the developing rat. Physiol. Biochem. Behav., 19 : 743-749.

REDMOND O., TUFFERY A.R., (1981), Thyroid proliferation, body weight, thyrotropin and thyroid hormones in chronic antithyroid (carbimazole) treatment in rats. J. Anat., 133 : 37-47.

ROBERTS E., FRANKEL S., HARMAN P.J., (1951), aminobutyric acid content and glutamic decarboxylase activity in developing mouse brain. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 78 : 799-803.

ROBERTS R.B., FLEXNER J.B., FLEXNER L.B., (1959), Biochemical and physiological differentiation during morphogenesis. XXIII. Further observations relating to the synthesis of amino acids and proteins by the cerebral cortex and liver of the mouse. J. Neurochem., 4 : 78-90.

ROBERTS W.W., DEMBER W.N., BRODERICK M., (1962), Alternation and exploration in rats with hippocampal lesions. J. Comp. Physiol. Psychol., 55 : 695-700.

ROBINSON A.M., WILLIAMSON D.H.,(1980), Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. Physiol. Rev., 60 : 143-187.

ROSE G.H., ELLINGSON R.J., (1970), Ontogenesis of evoked potentials. In : Developmental Neurobiology, Himwich W.A., Ed., Charles C. Thomas, Springfield, pp. 393-440.

RUDERMAN N.B., ROSS P.S., BERGER M., GOODMAN M.N., (1974), Regulation of glucose and ketone-body metabolism in brain of anesthetized rats. Biochem. J., 138 : 1-10.

SACKS W., (1957), Cerebral metabolism of isotopic glucose in normal human subjects. J. Appl. Physiol., 10 : 37-44.

SCHAIN R.J., WATANABE K., (1975), Effect of chronic phenobarbital administration upon brain growth of the infant rat. Exp. Neurol., 47 : 509-515.

SCHAIN R.J., WATANABE K., (1976), Origin of brain growth retardation in young rats treated with phenobarbital. Exp. Neurol., 50 : 806-809.

SCHOUSBOE A., (1977), Cell, Tissue and Organ Cultures in Neurobiology, Federoff S., Hertz L., Eds., Academic Press, New York, pp. 441-446.

SCHROEDER H., (1989), Influence d'un traitement chronique précoce au phénobarbital sur le prélèvement cérébral de glucose et des composés cétoniques chez le rat au cours du développement postnatal. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université de Nancy I.

SCHUIER F., ORZI F., SUDA S., KENNEDY C., SOKOLOFF L., (1981), The lumped constant for the [^{14}C] deoxyglucose method in hyperglycemic rats. J. Cereb. Blood Flow Metabol., 1 :S63.

SCHULZ D.W., MACDONALD R.L., (1981), Barbiturate enhancement of GABA mediated inhibition and activation of chloride ion conductance : correlation with anticonvulsant and anesthetic actions. Brain Res., 209 : 177-188.

SCHWARTZ R.D., JACKSON J.A., WEIGERT D., SKOLNICK P., PAUL S.M., (1985), Characterization of barbiturate-stimulated chloride efflux from rat brain synaptoneurosomes. J. Neurosci., 5 : 2963-2970.

SENSENBRENNER M., MADERSPACH K., LATZKOWITZ L., JAROS G., (1978), Neuronal cells from chick embryo cerebral hemispheres cultivated on polylysine-coated surfaces. Develop. Neurosci., 1 : 90-101.

SENSENBRENNER M., LABOURDETTE G., DELAUNOY J.P., PETTMANN B., DEVELLIERS G., MOONEN G., BOCK E., (1980), Morphological and biochemical differentiation of glial cells in primary culture. In : Tissue Culture in Neurobiology, Giacobini E., Vernadakis A., Shahar A., Eds., Raven Press, New York, pp. 385-395.

SERRANO E.E., KUNIS D.M., RANSOM B.R., (1988), Effects of chronic phenobarbital exposure on cultured mouse spinal cord neurons. Ann. Neurol., 24 : 429-438.

SETH P.K., ALLEVA F.R., TAKAGI S., YEN-KOO H.C., BALAZS T., (1987), Brain neurotransmitter receptor alterations in offspring of rats exposed to phenobarbital, phenytoin or their combination during pregnancy. Neurotoxicol., 8 : 45-54.

SHEPHERD, (1979), The Synaptic Organization of the Brain, Oxford University Press, New York.

SHEWOOD N.M., TIMIRAS P.S., (1970), A Stereotaxic Atlas of the Developing Rat Brain, University of California Press, Berkeley.

SIESJO B.K., (1978), Brain Energy Metabolism, John Wiley, New York, pp. 398-452.

SIMS K.L., PITTS F.N. (1970), Brain glutamate decarboxylase : changes in the developing rat brain. J. Neurochem., 17 : 1607-1612.

SKERRIT J.H., JOHNSTON G.A.R., (1983), Inhibition of amino acid transmitter release from rat brain slices by phenytoin and related anticonvulsants. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 10 : 527-533.

SNELL K., WALKER D.G., (1973), Glucose metabolism in the newborn rat. Temporal studies in vivo. Biochem. J., 132 : 739-752.

SOKOLOFF L., (1960), Metabolism of the central nervous system in vivo. In : Handbook of Physiology - Neurophysiology, Field J., Magoun H.W., Hall V.E., Eds., American Physiological Society, Washington, D.C., Vol. 3, pp. 1843-1864.

SOKOLOFF L., (1969), Cerebral circulation and behavior in man : strategy and findings. In : Psychochemical Research in Man, Mandell A.J., Mandell M.P., Eds., Academic Press, New York, pp. 237-252.

SOKOLOFF L., (1972), Circulation and energy metabolism of the brain. In : Basic Neurochemistry, Albers R.W., Agranoff B., Katzman R., Siegel G.J., Eds., Little Brown, Boston, pp. 299-325.

SOKOLOFF L., (1973), Changes in enzyme activities in neural tissues with maturation and development of the nervous system. In : The Neurosciences, Third Study Program, Schmidt F.O., Ed., MIT Press, Cambridge, Mass., pp. 885-898.

SOKOLOFF L., (1976), Circulation and energy metabolism of the brain. In : Basic Neurochemistry, 2nd Edn., Siegel G.J., Albers R.W., Katzman R., Agranoff B.W., Eds., Little Brown and Company, Boston, pp. 338-413.

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

SOKOLOFF L., (1986), Cerebral circulation, energy metabolism, and protein synthesis : general characteristics and principles of measurement. In : Position Emission Tomography and Autoradiography : Principles and Applications for the Brain and Heart, Phelps M., Mazziotta J., Schelbert H., Eds., Raven Press, New York, pp. 1-71.

SOKOLOFF L., FITZGERALD G.G., KAUFMAN E.E., (1977a), Cerebral nutrition and energy metabolism. In : Nutrition and the Brain, Wurtman R.J., Wurtman J.J., Eds., Raven Press, New York, Vol. 1, pp. 87-139.

SOKOLOFF L., REIVICH M., KENNEDY C., DES ROSIERS M.H., PATLAK C.S., PETTIGREW K.D., SAKURADA O., SHINOHARA M., (1977b), The [^{14}C] 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.

SOLS A., CRANE R.K., (1954), Substrate specificity of brain hexokinase. J. Biol. Chem., 210 : 581-595.

SOTELO J., GIBBS C., GAJDUSEK D., TOH B., WURTH M., (1980), Method for preparing cultures of central neurons : cytochemical and immunochemical studies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 : 653-657.

STERN L., CASHORE W.J., (1985), L'hyperbilirubinémie néonatale. In : Médecine Néonatale, Vert P., Stern L., Eds., Masson, Paris, pp. 804-822.

STORES G., (1981), Behavioral effects of antiepileptic drugs. In : Febrile Seizures, Nelson K.B., Ellenberg J.H., Eds., Raven Press, New York, pp. 185-192.

STRANG R.H.C., BACHELARD H.S., (1973), Rates of cerebral glucose utilization in rats anesthetized with phenobarbitone. J. Neurochem., 20 : 987-996.

STUDY R.E., BARKER J.L., (1981), Diazepam and (-)-pentobarbital : fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of γ-aminobutyric acid responses in cultured central neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 : 7180-7184.

STUMPF B., KRAUS H., (1979), Regulatory aspects of glucose and ketone body metabolism in infant rat brain. Pediatr. Res., 13 : 585-590.

SUDA S., SHINOHARA M., MIYAOKA M., KENNEDY C., SOKOLOFF L., (1981), Local cerebral glucose utilization in hypoglycemia. J. Cereb. Blood. Flow Metabol., 1 : S62

SWAIMAN K.F., STRIGHT P.L., (1973), The effects of anticonvulsants on in vitro protein synthesis in immature brain. Brain Res., 58 : 515-518.

THOMPSON P.J., TRIMBLE M.R., (1982), Anticonvulsant drugs and cognitive functions. Epilepsia, 23 : 531-544.

THOMPSON P.J., TRIMBLE M.R., (1983), Anticonvulsant serum levels : relationship to impairments of cognitive functioning. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 46 : 227-233.

THORN I., (1975), A controlled study of prophylactic long term treatment of febrile convulsions with phenobarbital. Acta Neurol. Scand, Suppl. 60 : 67- 73.

TICKU M.K., OLSEN R.W., (1978), Interaction of barbiturates with dihydropicrotoxinin binding sites related to the GABA receptor-ionophore system. Life Sci., 22 : 1643-1652.

TICKU M.K., RASTOGI S.K., (1986), Barbiturate-sensitive sites in the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. In : Molecular and Cellular Mechanisms of Anesthetics, Roth S.M., Miller K.W., Eds., Plenum Press, New York, pp. 179-188.

TILNEY F., (1933), Behavior in its relation to the development of the brain. II. Correlation between the development of the brain and behavior in the albino rat from embryonic states to maturity. Bull. Neurol. Inst. N.Y., 2 : 252-358.

TIMIRAS P.S., (1988), Thyroid hormones and the developing brain. In : Handbook of Human Growth and Developmental Biology, Meisami P., Timiras P.S., Eds., CRC Press, Boca Raton, Vol. 1, pp. 59-82.

TIMIRAS P.S., NZEKWE E. U., (1989), Thyroid hormones and nervous system development. Biol. Neonate, 55 : 376-385.

TOWER D.B., (1958), The effects of 2-deoxy-D-glucose on metabolism of slices of cerebral cortex incubated in vitro. J. Neurochem., 3 : 185-205.

TWYMAN R.E., ROGERS C.J., MACDONALD R.L., (1989), Differential regulation of -aminobutyric acid receptor channels by diazepam and phenobarbital. Ann. Neurol., 25 : 213-220.

VACCARI A., (1983), Effects of dysthyroidism on central monoaminergic neurotransmission. Monogr. Neurol. Sci., 9 : 78-90.

VALOES T., KIPOUROS K., PETMEKAZI S., SOLMAN M., DOXIADIS S.A., (1980), Effectiveness and safety of prenatal phenobarbital for the prevention of neonatal jaundice. Pediatr. Res., 14 : 947-952.

VALERINO D.M., VESSEL E.S., AURORI K.C., JOHNSON A.O., (1974), Effects of various barbirurates on hepatic microsomal enzymes. A comparative study. Drug Metab. Disp., 2 : 448-454.

VAN DEN BERG C.J., (1970), Compartmentation of glutamate metabolism in the developing brain : experiments with labelled glucose, acetate, phenylalanine, tyrosine and proline. J. Neurochem., 17 : 973-983.

VAN DEN BERG C.J., KRZALIC L.J., MELA P., WAELSCH H., (1969), Compartmentation of glutamate metabolism in brain. Evidence for the existence of two different tricarboxylic acid cycles in brain. Biochem. J., 113 : 281-344.

VARON S., (1975), Neurons and glia in neuronal cultures. Exp. Neurol., 48 : 93-134.

VARON S., RAIBORN C., (1969), Dissociation fractionation and culture of embryonic brain cells. Brain Res., 12 : 180-199.

VERNADAKIS A., WOODBURY D.M., (1962), Electrolyte and amino acid changes in rat brain during maturation. Am. J. Physiol., 203 : 748-752.

VINING E.P.G., MELLITS E.D., DORSEN M.M., CATALDO M.F., QUASKEY S.A., SPIELBERG S.P., FREEMAN J.M., (1987), Psychologic and behavioral effects of antiepileptic drugs in children : a double-blind comparison between phenobarbital and valproic acid. Pediatrics, 80 : 165-174.

VRBA R., GAITONDE M.K., RICHTER D., (1962), The conversion of glucose carbon into protein in the brain and other organs of the rat. J. Neurochem., 9 : 465-475.

WAELSCH H., (1951), Glutamic acid and cerebral function. In : Advances in Protein Chemistry, Anson M.L., Edsall J.T., Eds., Academic Press, New York, Vol. 6, pp. 299-341.

WAINWRIGHT P., PELKMAN C., WAHLSTEN D., (1989), The quantitative relationship between nutritional effects on preweaning growth and behavioral development in mice. Develop. Psychobiol., 22 : 183-195.

WALSH T.J., TILSON H.A., De HAVEN D.L., MAILMAN R.B., FISHER A., HANIN I., (1984), AF64A, a cholinergic neurotoxin, selectively depletes acetylcholine in hippocampus and cortex, and produces long-term passive avoidance and radial arm maze deficits in the rat. Brain Res., 321 : 91-102.

WARREN M.A., BEDI K.S., (1985), The effects of a lenghty period of undernutrition on food intake and on body and organ growth during rehabilitation. J. Anat., 141 : 65-75.

WAYMOUTH C., (1977), Nutritional requirements of cells in culture, with special reference to neural cells. In : Cell Tissue and Organ Cultures in Neurobiology, Federoff S., Hertz L., Eds., Academic Press, Inc., New York, pp. 631-648.

WERNER I., PETERSON G.R., SHUSTER L., (1971), Choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in cultured brain cells from chick embryos. J. Neurochem., 18 : 141-151.

WICK A.N., DRURY D.R., NAKADA H.I., WOLFE J.B., (1957), Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose. J. Biol. Chem., 224 : 963-969.

WIGGINS R.C., (1982), Myelin development and nutritional insufficiency. Brain Res. Rev., 4 : 151-175.

WIGGINS R.C., (1986), Myelination : a critical stage in development. Neurotoxicology, 7 : 103-120.

WILLIAMSON D.H., (1975), Regulation of the utilization of glucose and ketone bodies by brain in the perinatal period. In : Early Diabetes in Early Life, Camerini-Davalos R.A., Cole H.S., Eds., Academic Press, New York, pp. 195-202.

WILLIAMSON D.H., (1979), Recent developments in ketone body metabolism. Biochem. Soc. Trans., 7 : 1313-1321.

WILLIAMSON D.H., HEMS R., (1970), Assays in Cell Metabolism, Bartley W., Kornberg H.L., Quayle J.R., Eds., Wiley-Interscience, London, pp. 251-281.

WILLOW M., JOHNSTON G.A.R., (1983), Pharmacology of barbiturates : electrophysiological and neurochemical studies. Int. Rev. Neurobiol., 24 : 15-49.

WOLF S.M., FORSYTHE A., (1978), Behavior disturbance, phenobarbital and febrile seizures. Pediatrics, 61 : 728-731.

YAKUSHIJI T., OYAMA Y., AKAIKE N., (1989), Comparative study on barbiturates using isolated single neurons : GABA-mimetic action and augmentatory action on GABA response. Brain Res., 488 : 357-360.

YANAGIHARA T., HAMBERGER A., (1971), Effect of diphenylhydantoin on protein metabolism in neuron and neuroglial fractions of central nervous tissue. Exp. Neurol., 32 : 152-162.

YANAI J., (1979), Long term induction of microsomal drug oxidizing system in mice following prenatal exposure to barbiturate. Biochem. Pharmacol., 28 : 1429-1430.

YANAI J., (1983), Possible dopaminergic involvement in early phenobarbital induced changes in sensitivity to barbiturate. Teratology, 27 : 86A.

YANAI J., (1984), An animal model for the effect of barbiturate on the development of the central nervous system. In : Neurobehavioral Teratology, Yanai J., Ed., Elsevier, Amsterdam, pp. 111-132.

YANAI J., BERGMAN A., (1981), Neuronal deficits in mice after neonatal exposure to phenobarbital. Exp. Neurol. 73 : 199-208.

YANAI J., BERGMAN A., SHAFER R., YEDWAB J., TABAKOFF B., (1981), Audiogenic seizures and neuronal deficits following early exposure to barbiturate. Dev. Neurosci., 4 : 345-350.

YANAI J., FEIGENBAUM J.J., (1981), Lessened sensitivity to apomorphine induced hypothermia following prenatal exposure to phenobarbital. IRCS Med. Sci., 9 : 965.

YANAI J., GREENFELD Z., PICK C.G., TROMBKA D., (1987), Cholinergic mechanisms of behavioral deficits after prenatal exposure to phenobarbital. In : Muscarinic Cholinergic Mechanisms, Cohen S., Sokolovsky M., Eds., Freund, London, pp. 374-378.

YANAI J., ISER C., (1981), Stereologic study on Purkinje cells in mice following early exposure to phenobarbital. Exp. Neurol. 74 : 707-716.

YANAI J., LAXER U., PICK C.G., TROMBKA D., (1989), Dopaminergic denervation reverses behavioral deficits induced by prenatal exposure to phenobarbital. Develop. Brain Res., 48 : 255-261.

YANAI J., PICK C.G., (1988), Neuron transplantation reverses phenobarbital-induced behavioral birth defects in mice. Int. J. Dev. Neurosci., 6 : 409-416.

YANAI J., ROSSELLI AUSTIN L., TABAKOFF B., (1979), Neuronal deficits in mice following prenatal exposure to phenobarbital. Exp. Neurol. 64 : 237-244.

YANAI J., WANICH A., (1985), Prenatal versus neonatal long term effect of phenobarbital on mouse microsomal drug-oxidizing system. Biol. Neonate, 48 : 269-273.

YAVIN E., YAVIN Z., (1974), Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemispheres on polylysine-coated surface. J. Cell Biol., 62 : 540-546.

YAVIN Z., YAVIN E., (1980), Survival and maturation of cerebral neurons on poly (L-lysine) surfaces in the absence of serum. Develop. Biol.,j 75 : 454-459.

ZEMP J.W., MIDDAUGH L.D., (1975), Some effects of prenatal exposure to δ -amphetamine sulfate and phenobarbital on developmental neurochemistry and on behavior. Addict. Dis., 2 : 307-331.

LISTE DES PUBLICATIONS

MEMOIRE A : PEREIRA DE VASCONCELOS A. and NEHLIG A.
Effects of early chronic phenobarbital treatment on the maturation of energy metabolism in the developing rat brain. I. Incorporation of glucose carbon into amino acids.
Develop. Brain Res., 1987, 36 : 219-229.

MEMOIRE B : PEREIRA DE VASCONCELOS A., SCHROEDER H. and NEHLIG A.
Effects of early chronic phenobarbital treatment on the maturation of energy metabolism in the developing rat brain. II. Incorporation of ß-hydroxybutyrate into amino acids.
Develop. Brain Res., 1987, 36 : 231-236.

MEMOIRE C : NEHLIG A., PEREIRA DE VASCONCELOS A. and VERT P.
Effects of phenobarbital on energy metabolism in the developing brain. In : Neonatal Seizures : Pathophysiology and Pharmacological Management, Vert P., Wasterlain C., Eds., Raven Press, New York, 1990, sous presse.

MEMOIRE D : PEREIRA DE VASCONCELOS A., BOYET S. and NEHLIG A.
Consequences of an early chronic phenobarbital treatment on postnatal evolution of local cerebral glucose utilization in the rat.
Develop. Brain Res., sous presse.

MEMOIRE E : PEREIRA DE VASCONCELOS A., COLIN C., DESOR D., DIVRY M. and NEHLIG A.
Influence of early neonatal phenobarbital exposure on cerebral energy metabolism and behavior.
Exp. Neurol., sous presse.

MEMOIRE F : PEREIRA DE VASCONCELOS A., COLIN C., BOYET S. and NEHLIG A.
Effets à court et à long terme d'un traitement chronique précoce au phénobarbital sur la maturation du métabolisme énergétique cérébral et sur le comportement.
Circ. Métabol. Cerveau, 1989, 6, sous presse.

MEMOIRE G : DAVAL J.L., PEREIRA DE VASCONCELOS A. and LARTAUD I.
Morphological and neurochemical influence of diazepam and phenobarbital on selective culture of neurons from fetal rat brain.
J. Neurochem., 1988, 50 : 665-672.

MEMOIRE A

Developmental Brain Research, 36 (1987) 219–229
Elsevier

BRD 50620

Effects of early chronic phenobarbital treatment on the maturation of energy metabolism in the developing rat brain. I. Incorporation of glucose carbon into amino acids

Anne Pereira de Vasconcelos and Astrid Nehlig

INSERM U. 272, Pathologie et Biologie du Développement Humain, Université de Nancy I, Nancy (France)

(Accepted 24 March 1987)

Key words: Energy metabolism; Glucose; Amino acid; Developing rat brain; Thyroid hormone; Phenobarbital; Barbiturate; Chronic treatment

The influence of phenobarbital (PhB) on the utilization of glucose by the cerebral cortex and the cerebellum was studied in rats during postnatal development. The animals were treated from day 2 to day 35 after birth by a daily injection of 50 mg/kg PhB or by saline. The rats were studied at 5 postnatal stages: 7, 10, 14, 21 and 35 days. PhB treatment induced a 10% decrease in body and brain weight over the whole period studied and a transient significant decrease in circulating thyroxin levels at 14 days after birth. Amino acid levels in the cerebral cortex and particularly in the cerebellum were not greatly affected by the pharmacological treatment. The conversion of [2-^{14}C]glucose into amino acids was significantly decreased in both cerebral structures between day 7 and day 14 after birth. The distribution of radioactivity between amino acids was not affected in the cerebral cortex but was significantly changed by PhB treatment in the cerebellum. Specific radioactivity values of amino acids were lower in PhB- than in saline-treated animals in both studied structures. The results of the present study show that glucose utilization is reduced in the brain of PhB-treated animals as compared to the controls and that the cerebellum seems to be more affected than the cerebral cortex.

INTRODUCTION

Phenobarbital (PhB) is an anticonvulsant drug largely administered both to epileptic mothers, even during their pregnancy, and to neonates suffering from convulsive seizures or hyperbilirubinemia[37,44]. However, there is only very scarse information upon how barbiturate administration can affect the development of fetal and neonatal nervous systems. The administration of PhB to pregnant mice or their offspring during the 3 weeks following birth induces a decrease in body and brain weight[33]. This kind of treatment also results in long-lasting cellular destruction in the brain of young animals, especially at the level of cerebellar Purkinje cells and hippocampal pyramidal cells. This cellular damage appears whether the barbiturate treatment has been pre- or postnatal, showing that PhB is able to disturb neuron differentiation as well as to destroy already formed neurons[39–43]. In the adult brain, barbiturate treatment has been shown to induce an inhibition of GABA uptake[5] and to alter protein synthesis[32]. However, the effects of an early barbiturate treatment on the biochemistry of the developing brain have not been extensively studied.

PhB administration during the neonatal period has been shown to disturb thyroid maturation and to induce the disappearance of the peak of serum free thyroxin (T4) levels present at the end of the second week in rodents[10,11]. This marked increase in circulating T4 concentrations coincides with an important brain growth spurt[2]. Hypothyroidism at this period of life results in permanent neural damage, particularly in the cerebellum[26,28]. This damage includes loss in

Correspondence: A. Pereira de Vasconcelos, INSERM U. 272, Pathologie et Biologie du Développement Humain (Dir. P. Vert), Université de Nancy I, 30, rue Lionnois, B.P. 3137, 53013 Nancy Cédex, France.

0165-3806/87/$03.50 © 1987 Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division)

the number of neurons, delayed neural differentiation[26] and decreased number of synapses in the adult brain[4]. Thyroid deficiency in young rats is also able to induce neurochemical disturbances, such as depression and retardation of myelinogenesis[20,35], and lowering in the rate of oxidative metabolism and in the activity of mitochondrial enzymes[16,17].

The fundamental characteristic of mature brain energy metabolism in vivo is the rapid and important incorporation of glucose carbon into cerebral amino acids. This metabolic pathway develops sharply at the so-called 'critical period' from 10 to 15 days after birth in the rat[15], during which the cortex becomes functionally mature[12]. Neonatal thyroidectomy results in a significant retardation of this phenomenon[3]. In the present study, we examined the relationship between an early chronic PhB treatment, free serum thyroid hormone concentrations and the maturation of the incorporation of glucose carbon into the amino acids of the developing rat brain.

MATERIALS AND METHODS

Animals and pharmacological treatment

Adult Sprague–Dawley rats, 1 male and 2 females, were housed together in mating groups for 5 days and constantly maintained under standard laboratory conditions on a 12:12 h light/dark cycle (lights on at 06.00 h). Food and water were available ad libitum. After delivery, litter sizes were reduced to 12 pups. Sodium phenobarbital (5-ethyl-5-phenylbarbituric acid, sodium salt, Fluka, Buchs, Switzerland), dissolved in saline was administered subcutaneously to the pups from day 2 to day 35 after birth, daily at a dose of 50 mg/kg. Control animals received the same volume of saline. The animals received their daily injection between 08.00 and 08.30 h and blood and tissue samples for the studies were taken about 3 h later between 11.00 and 11.30 h. The animals were studied at 5 developmental stages, at 7, 10, 14, 21 and 35 days after birth, respectively.

Plasma glucose, phenobarbital and thyroid hormone measurement

Plasma glucose concentration was determined by means of a Hitachi analyzer, model 705. Plasma PhB levels were measured by radiative energy attentuation applied to fluorescence polarization immunoassay by means of TDX analyzer (Abbott Instruments, Wiesbaden, F.R.G.), according to the method described by Jolley et al.[18] and Lu-Steffes et al.[23]. The concentrations of the plasma-free thyroid hormones, T3 (triiodothyronine) and T4 (thyroxine) were determined by radioimmunoassay according to the method described by Midgley and Wilkins[24], using the Amerlex-free T3 and T4 RIA kit from Amersham (Buckinghamshire, U.K.). For all these dosages, blood samples from 3–5 animals were mixed at the first 3 studied stages, those from 1–2 rats were used at 21 and 35 days after birth.

Administration of [2-^{14}C]glucose

Control and PhB-treated animals received an intraperitoneal injection of 7–10 μCi/100 g body wt. of [2-^{14}C]glucose (spec. act. 45–55 mCi/mmol; New England Nuclear, Boston, MA). The animals were returned to their usual environment, back to their mother for suckling animals, and allowed food and water ad libitum. At 30 min after the administration of [2-^{14}C]glucose, the animals were killed by decapitation followed by immediate immersion of the head into liquid nitrogen at the stages of 21 and 35 days, or by immersion of the whole body into liquid nitrogen at the stages of 7, 10 and 14 days. Thereafter, the heads were kept at −80 °C.

Treatment of the tissues

The brains were dissected out into two parts, the cerebral cortex and the cerebellum in a cold room at 2 °C. The brains of 3 animals were pooled at 7 and 10 days, 2 rats were taken at 14 days after birth and one single animal at 21 and 35 days. The tissue was weighed and dispersed in 6% (v/v) perchloric acid (about 5 ml perchloric acid solution per g of brain tissue)[14] by means of an ultra-turrax. The suspension was centrifuged at 3000 *g* for 15 min at 2 °C and the supernatant was neutralized by 2 N KOH and kept at 2 °C for 24 h in order to precipitate all K-perchlorate. After a centrifugation at 3000 *g* for 15 min at 2 °C, the supernatant solutions were passed through a cation-exchange resin (Amberlite IRN-77, H^+ form) and then through an anion-exchange resin (Dowex 2, formate form). The amino acids adsorbed on Amberlite IRN-77 resin were eluted with 3 N NH_4OH; the carboxylic acids adsorbed on Dowex 2 resin were eluted with 3 N HCOOH. These two eluates and the

TABLE I

Plasma phenobarbital and glucose concentrations

Values are means ± S.D. of the number of animals in parentheses.

Age of the animals (days)	*Phenobarbital (μg/ml)*	*Glucose (mmol/l)*	
	PhB-treated animals	*Control animals*	*PhB-treated animals*
7	64 ± 5 (6)	6.7 ± 0.6 (9)	6.4 ± 0.5 (11)
10	70 ± 7 (6)	7.9 ± 0.7 (6)	6.8 ± 0.5 (6)*
14	80 ± 9 (10)	8.2 ± 0.6 (9)	7.6 ± 0.4 (11)*
21	53 ± 6 (8)	8.2 ± 0.5 (10)	7.7 ± 0.4 (11)*
35	41 ± 5 (11)	8.1 ± 0.5 (14)	8.0 ± 0.5 (12)

* $P < 0.05$, statistically significant difference from controls.

water washings from the Dowex 2 column containing the glucose fraction were evaporated until dry in a rotating evaporator under vacuum at 40 °C. The residues were dissolved in determined volumes of 10% isopropanol for the amino acid fraction and distilled water for the carboxylic and glucose fraction. The radioactivity of the different fractions of the cerebral acid-soluble extract was estimated by liquid scintillation counting in a Beckman scintillation counter, model LS 1801 (Beckman Instruments, Fullerton, S.A.).

Treatment of the amino acid fraction

The concentration of the different amino acids was determined by means of an amino acid analyzer LKB, model 4151 Alpha Plus (LKB Instruments, Bromma, Sweden). The radioactivity of the individual amino acids was measured after a bidimensional separation on thin-layer chromatography. The first solvent was a mixture of pyridine:acetone:ammonia:distilled water (45:30:5:20, v/v) and the second solvent was a solution of isopropanol:formic acid:distilled water (72:14:14, v/v). When dry, the plates were sprayed according to the method described by Lindeberg[22] with a solution of 0.1% *o*-phtalaldehyde and 0.1% 2-mercaptoethanol in acetone, followed 5 min later by 1% triethylamine in acetone. After 10 min the plates were viewed under a long-wave (350 nm) ultraviolet lamp. Glutamate, glutamine, aspartate and GABA spots were localized and scraped out into scintillation vials containing 1 ml of 0.1 N HCl. The vials were shaken for 2 h, 10 ml of T-Scintran

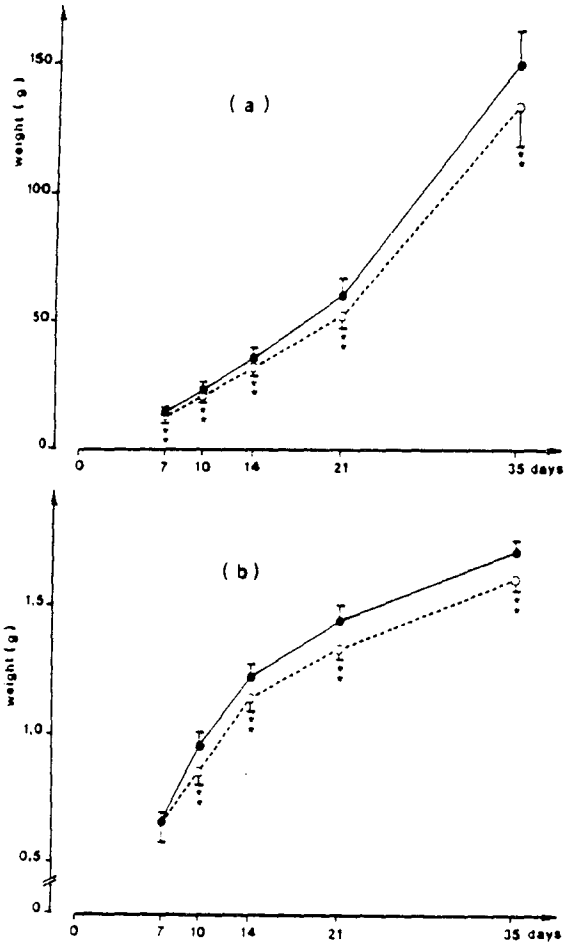


Fig. 1. Influence of PhB on postnatal evolution of body weight (a) and brain weight (b) in the rat. Values expressed as g, are means ± S.D. of 8–36 animals. **$P < 0.01$, statistically significant differences between control (●——●) and PhB-treated animals (○- - -○).

(BDH Chemicals Ltd, Poole, U.K.) were added and the radioactivities of the individual amino acids were estimated by means of a Beckman scintillation counter, model LS 1801. The concentration and the radioactivity of the individual amino acids were determined on two separate aliquots of the same experimental sample.

Statistical analysis

For statistical analysis, Student's *t*-test was applied to differences between the values obtained in saline- and in PhB-treated animals. In addition, the whole age course of the amino acid concentrations as affected by PhB treatment was analyzed using a 2-way analysis of variance.

RESULTS

General effects of phenobarbital treatment

There was no significant difference in the rate of neonatal mortality in saline- and PhB-treated rat pups, demonstrating that the 50 mg/kg PhB dose used in the study was far below the LD_{50} for this drug in the rat. The early administration of 50 mg/kg PhB to developing rats did not induce any prominent differences in physical maturation signs and general behavior of the animals. PhB treatment only seemed to delay by 2 or 3 days eye-opening and hair coming out. In 7- to 14-day-old rats, the administration of the drug induced a transient sedation but no anesthetic effect and did not seem to have any significant incidence on the frequency of suckling of PhB-treated pups, as compared to control animals. At 21 and 35 days, when the circulating concentration of PhB was lower (Table I), locomotor activity and general exploratory behavior were slightly reduced by chronic exposure to the drug. Within the 3–4 h following the daily 50 mg/kg PhB treatment, there was no change in body temperature of the rats, whatever the studied stage was.

Body and brain weight

The administration of PhB induced a decrease in the body weight of the PhB-treated animals as compared to the controls, which ranged from 6 to 14% and was statistically significant at all studied stages (Fig. 1a). The pharmacological treatment also induced a significant reduction in the brain weight of the PhB-treated animals, which appeared at 10 days after birth and ranged from 6 to 11% (Fig. 1b).

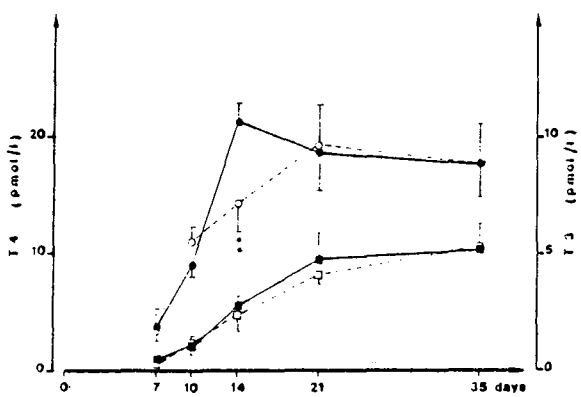


Fig. 2. Influence of PhB on postnatal evolution of plasma thyroid hormones (T4, circle symbols and T3, square symbols) in the rat. Values, expressed as pmol/l, are means ± S.D. of 5–10 samples. $^{**}P < 0.01$, statistically significant difference between control (black symbols) and PhB-treated animals (open symbols).

Plasma phenobarbital and glucose concentrations

As shown in Table I, plasma PhB concentrations increased between day 7 and day 14 and were reduced two-fold between 14 and 35 days after birth. Plasma glucose levels in control animals increased by 18% between day 7 and day 10 and did not change from 10 to 35 days. In PhB-treated animals, plasma glucose concentration was about the same as in controls at 7 days, remained significantly lower than in saline-treated animals between days 10 and 21, and reached at 35 days the same value as in controls.

Plasma thyroid hormone concentration

As shown in Fig. 2, the levels of circulating T4 found in saline- and PhB-treated animals were the same at all developmental stages, except at 14 days after birth where the peak of circulating T4 seen in control animals was completely eliminated in PhB-treated animals. The levels of T3 increased during the whole developmental period and were not affected by pharmacological treatment at any studied age.

Distribution of ^{14}C into the three fractions of the acid-soluble extract

As shown in Fig. 3, in control animals the percentage of radioactivity remaining in the glucose fraction was always lower than in the amino acid fraction in both studied structures and at all developmental stages. The percentage of labeling in the glucose fraction decreased with development of the animals while the percentage of radioactivity in the amino acid fraction increased to reach a very high value at 35 days after birth. In PhB-treated animals, the percentage of radioactivity in the glucose fraction remained higher than in the amino acid fraction at 7 and 10 days after birth in both studied structures. The reverse was true from the 14th to the 35th day. The percentage of labeling in the glucose fraction was significantly higher and the one in the amino acid fraction significantly lower in PhB- than in saline-treated rats at 7, 10 and 14 days of age. There was no significant difference in the distribution of radioactivity be-

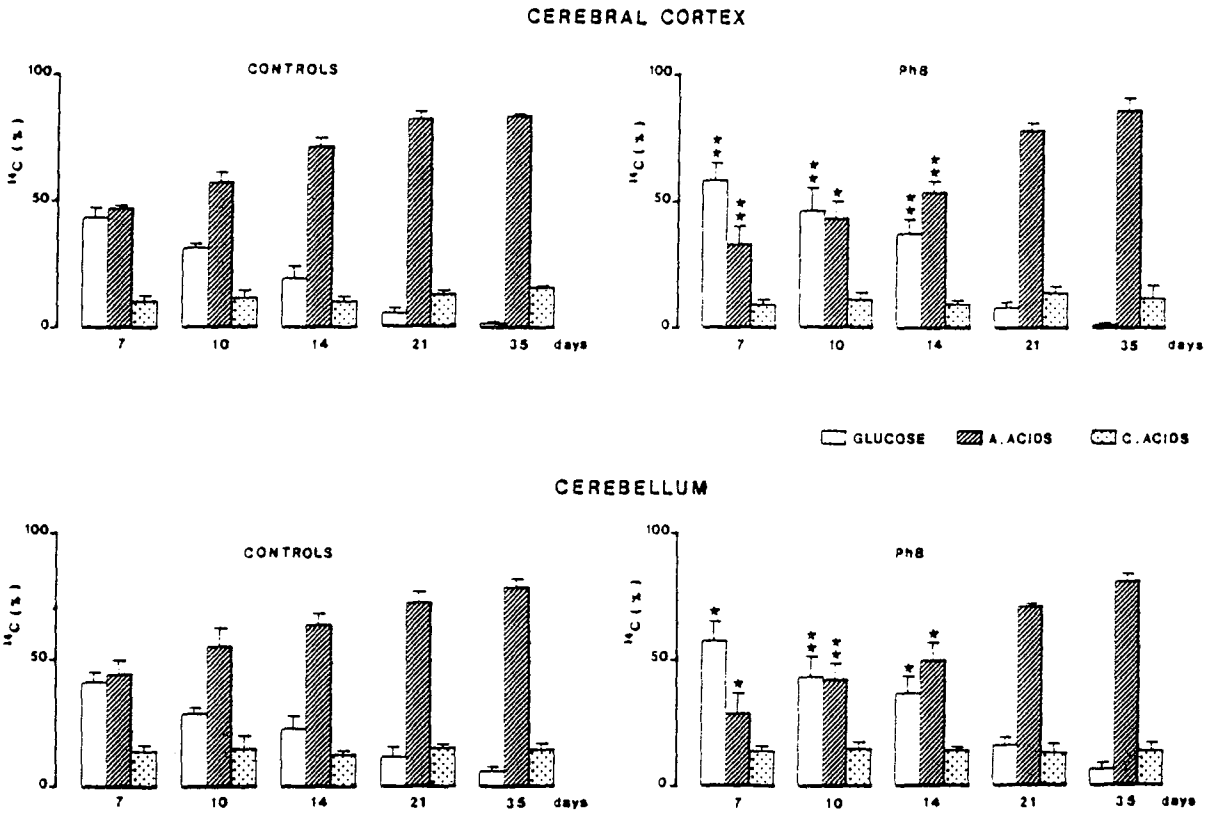


Fig. 3. Influence of PhB on postnatal evolution of the distribution of ^{14}C (%) from [2-^{14}C]glucose between the 3 fractions of the acid-soluble extract in the cerebral cortex and the cerebellum of the rat. Values are means ± S.D. of 3–4 experiments. $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$, statistically significant differences between control and PhB-treated animals. Abbreviations: A. Acids, amino acids; C. Acids, carboxylic acids.

tween glucose and amino acids in both rat groups at 21 or 35 days. The radioactivity in the carboxylic acid fraction was low and did not significantly change as a function of animal's age or pharmacological treatment.

Amino acid concentration

The concentrations of glutamate, glutamine, aspartate and GABA in cerebral cortex and cerebellum reached at 7 days a value of about 35–70% of their respective level at 35 days (Fig. 4). In both studied structures, the levels of glutamate, glutamine and GABA regularly increased over the whole considered developmental period, whereas aspartate levels reached a peak value at 21 days, particularly in the cerebellum.

This postnatal increase in cerebral amino acid contents was statistically significant over the whole studied period, as shown by the results of the 2-way analysis of variance (f values ranging from 10.48 to 93.88). The chronic PhB treatment had a significant incidence on the concentration of cortical glutamate (f = 9.68, $P < 0.01$), glutamine (f = 4.28, $P < 0.05$) and GABA (f = 10.04, $P < 0.01$), but no effect on the level of cortical aspartate and of all cerebellar amino acids. However, there was no apparent interaction in any of the 2-way analyses of variance performed (f values ranging from 0.21 to 2.18). In cerebral cortex, PhB treatment did not induce changes in any amino acid concentration at 7 days after birth. At the other stages, as shown by the results of a Student's t-test, glutamate concentration in the cerebral cortex of PhB-treated rats was significantly reduced by 24 and 11% as compared to the control values at 14 and 21 days after birth respectively. Glutamine concentration was significantly decreased by 20 and 12% at 10 and 35 days after birth. For aspartate, the concentration only significantly decreased by 34% at 14 days and was not affected at 21 days and 35 days. PhB treatment induced a significant 29 and 23% decrease

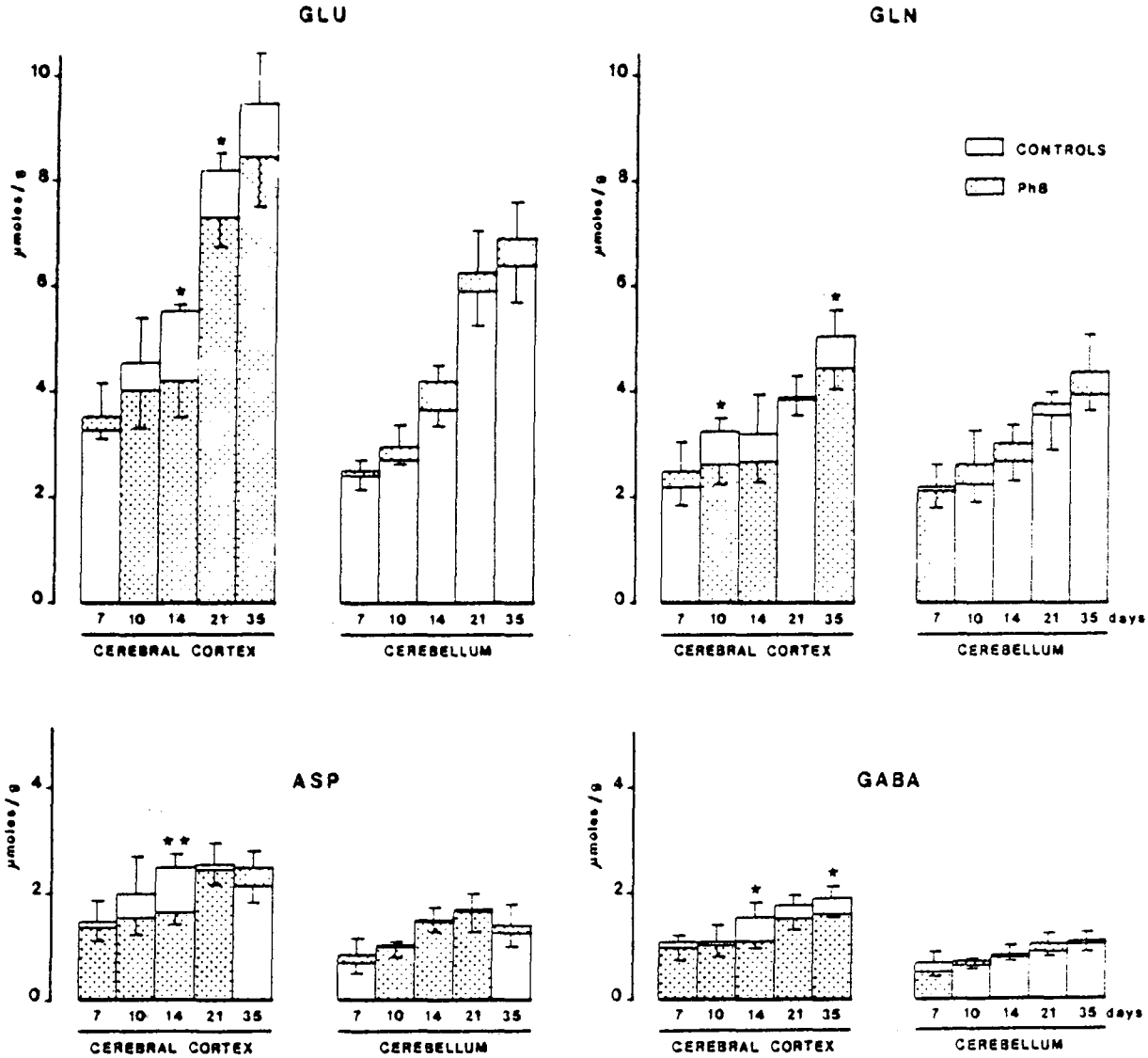


Fig. 4. Influence of PhB on postnatal evolution of amino acid concentration in the cerebral cortex and cerebellum in the rat. Values, expressed as μmol/g of tissue are means ± S.D. of 3–4 experiments. $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$, statistically significant differences between saline- and PhB-treated animals. GLU, glutamate; GLN, glutamine; ASP, aspartate.

in GABA concentration at 14 and 35 days respectively, as compared to control values.

In the cerebellum of control animals, the concentrations of the 4 amino acids were lower than in the cerebral cortex and reached 50–70% of their respective levels in the control cerebral cortex. There was no significant difference in the cerebellar concentration of any amino acid over the studied period, whether the rats were chronically treated by saline or PhB.

Distribution of radioactivity between the different amino acids

As shown in Fig. 5, the sum of the radioactivities of the 4 studied amino acids (glutamate, glutamine, aspartate and GABA), expressed as dpm/g (the other amino acids were under the level of accurate estimation for radioactivity) increased over the studied developmental period, particularly between 10 and 21 days after birth. The total incorporation of radioactivity into these amino acids was always lower in PhB- than in saline-treated animals and also lower in

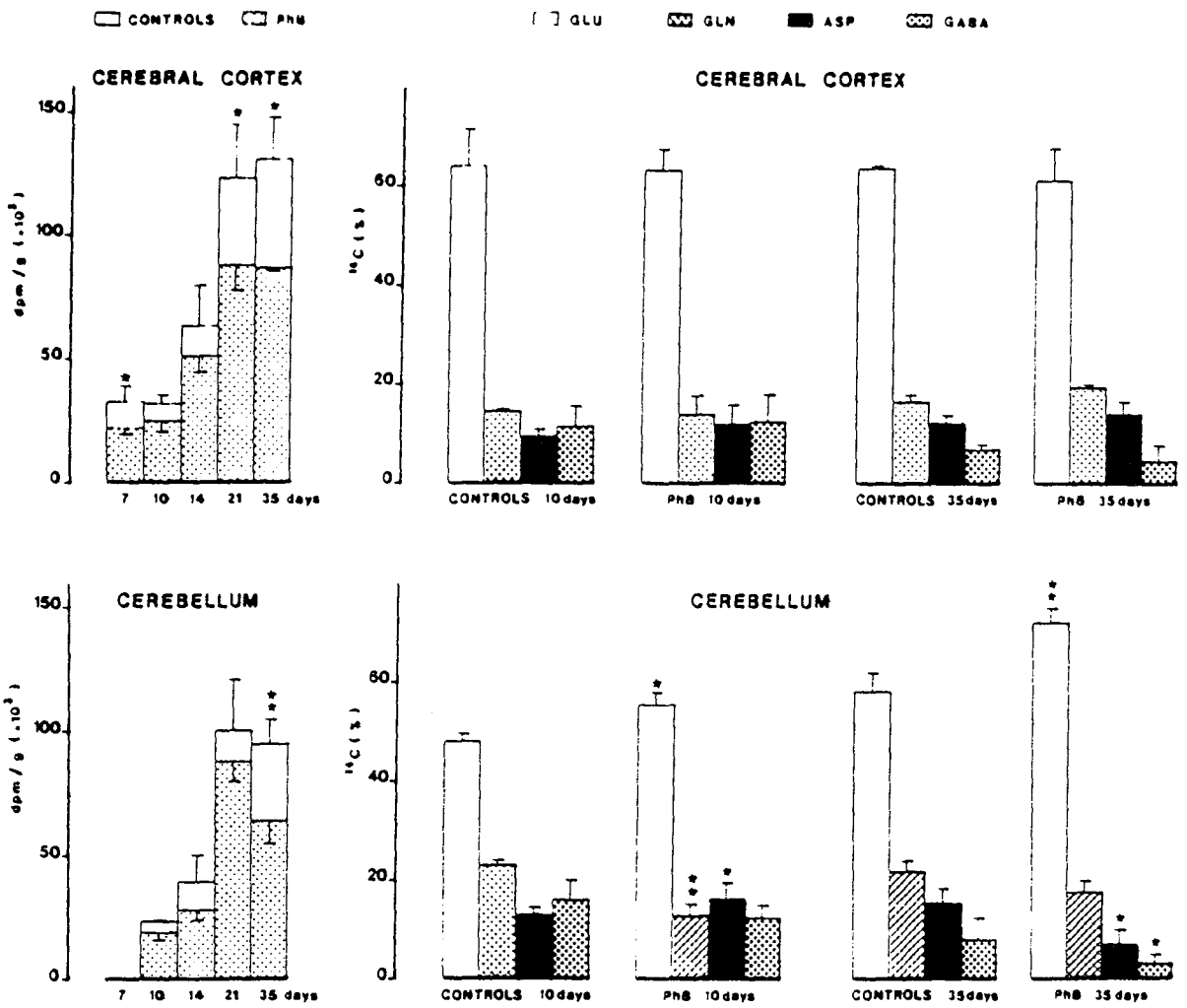


Fig. 5. Influence of PhB on postnatal evolution of the total radioactivity of amino acids, expressed as dpm/g (left part of the Figure) and of the distribution of ^{14}C (%) between the different amino acids (right part of the Figure) in the cerebral cortex and the cerebellum of the rat. Values are means ± S.D. of 3–4 experiments. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, statistically significant differences between saline-and PhB-treated animals. GLU, glutamate; GLN, glutamine; ASP, aspartate.

the cerebellum than in the cerebral cortex at all studied stages. The distribution of radioactivity between glutamate, glutamine, asparate and GABA in the cerebral cortex was approximately the same at 10 and 35 days after birth in saline- and PhB-treated animals, but the percentage of radioactivity was higher in glutamine and lower in GABA at 35 days than at 10 days. In the cerebellum, the percentage of radioactivity in glutamate was higher at 35 than at 10 days and also higher in PhB- than in saline-treated rats. In 10-day-old rats, PhB treatment induced a significant decrease in the percentage of labeling in glutamine and an increase in aspartate. In 35-day-old PhB-treated rats, the percentage of radioactivity in aspartate and GABA was significantly lower than in control animals.

Specific radioactivities of amino acids

As shown in Table II, specific radioactivity values increased between 10 and 35 days for both studied structures and pharmacological treatments. The specific radioactivies of the 4 different amino acids were significantly lower in PhB- than in saline-treated animals in cerebral cortex and cerebellum at both stages. In the cerebral cortex, the specific radioactivities relative to glutamate (RSR) increased with

TABLE II

Specific radioactivities of amino acids in the cerebral cortex and cerebellum of saline- and phenobarbital-treated 10- and 35-day-old rats

Values, expressed as dpm/μmol of amino acid, are means ± S.D. of 3–4 experiments. The specific radioactivity of each amino acid relative to glutamate is indicated in parentheses.

	Cerebral cortex				*Cerebellum*			
	10 Days		*35 Days*		*10 Days*		*35 Days*	
	Saline	*PhB*	*Saline*	*PhB*	*Saline*	*PhB*	*Saline*	*PhB*
Glutamate	4114 ± 596	3431 ± 371	8293 ± 124	6360 ± 364**	4244 ± 98	3656 ± 533	7582 ± 134	6708 ± 317*
Glutamine	1322 ± 130	1352 ± 405	4626 ± 414	3575 ± 50**	2393 ± 46	901 ± 162**	4642 ± 346	2598 ± 179**
	(0.32)	(0.39)	(0.56)	(0.56)	(0.56)	(0.25)	(0.61)	(0.39)
Aspartate	2521 ± 132	1662 ± 227**	6223 ± 102	4648 ± 310**	2867 ± 100	1766 ± 532*	4881 ± 92	3163 ± 185**
	(0.61)	(0.48)	(0.75)	(0.73)	(0.67)	(0.48)	(0.64)	(0.47)
GABA	2680 ± 203	1412 ± 324**	4785 ± 636	2510 ± 1153*	3335 ± 74	1837 ± 260**	4705 ± 95	1934 ± 84**
	(0.65)	(0.41)	(0.58)	(0.39)	(0.79)	(0.51)	(0.62)	(0.29)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, statistically significant differences between saline- and PhB-treated animals.

animal's age; PhB treatment induced a decrease in GABA RSR values at 10 days as compared to the values in controls, whereas RSR values of glutamine and aspartate were not affected by the nature of the treatment. In the cerebellum, the RSR values did not change between 10 and 35 days in control animals; in PhB-treated rats, however, the RSR for glutamine increased, whereas that for aspartate and GABA decreased between 10 and 35 days after birth.

DISCUSSION

The results of the present study show that an early chronic PhB treatment induces a retardation in the appearance of the rapid incorporation of glucose carbon into amino acids in the cerebral cortex and the cerebellum of developing rats. The decrease in energy metabolism seems to be more pronounced in the cerebellum than in the cerebral cortex, showing the greater vulnerability of the former structure.

The retardation in body and brain growth of the rats lasted throughout the whole studied period, and was of the same order of magnitude as indicated in previous studies on rats receiving 60 mg/kg/day PhB[6,33]. Since no difference in the frequency of suckling episodes could be noticed between PhB- and saline-treated rats, this effect of PhB seems to be direct and not mediated through undernutriton or changes in maternal care, as previously shown with artificially reared pups[6]. The conversion of glucose carbon into amino acids reflects the final coordination of energy metabolism in the brain. This metabolic pathway essentially develops between 10 and 15 days after birth in the rat[15] at a period of important growth spurt[2], which also coincides with a marked increase in the levels of circulating T4[10,11]. Neonatal thyroidectomy which results in structural changes in the central nervous system, including the retardation of neuronal processes[2,16,20], has been shown to induce a severe retardation in the development of the progressive increase of glucose carbon incorporation into amino acids[3]. In the present study, where T4 levels are only transiently lowered between 10 and 14 days after birth by the PhB treatment, the delayed maturation of this metabolic pathway is also manifest, but it is already apparent at 7 and 10 days after birth (Fig. 3), when the levels of T4 in PhB-treated animals are the same as in controls. These results demonstrate that the effects of PhB on the development of energy metabolism seem to be direct effects, at least at the more precocious studied stages and may be partly mediated by the transient hypothyroidism induced by PhB between 10 and 14 days after birth. At 21 and 35 days after birth, e.g. after the most critical periods of brain development and when T4 levels are back to normal values and the concentrations of circulating PhB lower, the rate of incorporation of glucose carbon into amino acids reaches the same value whether the rats have been treated by PhB or by saline (Fig. 3).

The sum of the radioactivity found in the 4 studied amino acids is lower in PhB- than in saline-treated

rats at all studied stages and in both brain structures (Fig. 5). This global decrease in the efficiency of overall brain energy metabolism induced by PhB, as previously shown in adult brains[19,30,34], also translates into a general reduction in the values of specific radioactivities of amino acids in PhB-treated rats. In the cerebral cortex, the distribution of ^{14}C from [2-^{14}C]glucose in glutamate, glutamine, aspartate and GABA is not affected by a PhB treatment. In the cerebellum, the effect of PhB treatment on amino acid metabolism is more apparent than in the cerebral cortex. At both studied stages, the percentage of radioactivity remaining in glutamate is higher in PhB- than in saline-treated animals (Fig. 5), whereas the contrary is true for the 3 other amino acids, as confirmed by the lower values of RSR and of the percentage of ^{14}C in these amino acids.

Whereas PhB treatment induces more changes in the distribution of ^{14}C from [2-^{14}C]glucose in amino acids in the cerebellum than in the cerebral cortex, the reverse is true for amino acid concentrations. The postnatal evolution of control cortical and cerebellar amino acid concentrations is very comparable to previously published results[1,9,31]. Amino acid concentrations reach lower levels in the cerebellum than in the cerebral cortex over the whole developmental period. Cerebellar amino acid levels are not affected by the PhB treatment, whatever the studied stage may be (Fig. 4). In the cerebral cortex, the levels of amino acids are the same in saline- and PhB-treated rats at 7 days after birth. Between 10 and 35 days, the concentrations of the 4 studied amino acids are decreased by a PhB treatment reaching statistical significance especially at 14 days after birth (Fig. 4), when plasma T4 levels are also decreased.

These results show that PhB treatment delays the overall rate of glucose utilization in the developing cerebral cortex and cerebellum, especially acquisition of the high efficiency of brain amino acid biosynthesis from glucose. However, from weaning time, the distribution of radioactivity between cerebral glucose, amino acids and carboxylic acids is the same in saline- and PhB-treated animals, reflecting either a tolerance phenomenon to PhB or the more active clearance and the shorter half-life of the drug at these stages of development, as previously shown in rats[6,33] and mice[39,40]. The overall reduction in brain energy metabolism translates into a decrease in the values of total radioactivity in amino acid fraction (expressed as dpm/g) and in specific radioactivity values of the amino acids. The cerebellum seems to be more affected in this way than the cerebral cortex. Indeed, it is well-known that the cerebellum is a quite vulnerable structure and that, in general, insults to the developing brain affect the cerebellum more than other areas[7]. This fragility originates in the fact that the cerebellar growth spurt begins later and ends sooner than the general brain growth spurt[8]. This greater cerebellar vulnerability has already been shown for PhB, since a neonatal PhB treatment induces neuronal deficits which are more extensive in the cerebellum than in the cerebral cortex[38,42].

During the period of active growth spurt, the brain is especially vulnerable to a variety of influences, including, among other factors, nutritional intake[36], hormonal changes[2,3,16] and drug exposure[39]. It appears difficult, however, to attribute retardation in the rapid conversion of glucose into cerebral amino acids observed in the present study as a result of an early chronic PhB exposure solely to the drug itself. First, some of the effects could at least be partly mediated by hypothermia, which has been shown to enhance the depression in glucose utilization induced by central nervous system depressants[25]. However, in the present study, there was no incidence of PhB on body temperature within the 3 h following the injection of the non-anesthetic dose of 50 mg/kg PhB at any studied stage. On the second hand, undernutrition has a marked effect on glucose metabolism and has been shown to induce an overall depression of glucose utilization in the brain and the body as a whole[27]. Indeed, sedation-induced undernutrition could accompany barbiturate administration in rat pups. Nevertheless, in the present study, we could not notice any significant difference in the frequency of suckling of PhB-treated rat babies, as compared to controls. In a previous study on artificially reared rat pups, using chronic intragastric feeding canulas, Diaz et al.[6] could demonstrate that PhB directly alters brain growth of the infant rat during early life and that this effect is greater than would be expected by reduced caloric intake alone. Moreover, the neuromorphological deficits induced by a chronic PhB treatment, especially at the level of the dendritic tree of cerebellar Purkinje cells[42], are very mild in contrast to the extensive damage induced at this level by

undernutrition[29]. In fact, PhB-induced effects on the central nervous system are quite similar to deficits observed after ethanol treatment. Ethanol and barbiturates are both sedative hypnotics which cause similar depression of the depolarization induced by calcium influx across synaptosomal membranes in adult animals[13,21]. In addition, barbiturate and ethanol have a similar neurotoxic effect on the developing brain. Unlike many other drugs or insults, they both destroy not only the proliferating, migrating and differentiating cells, but even already formed neurons. In addition, the types of the affected cells and layers, and the extent of the deficits appeared to be very similar with both drugs[38]. It then appears that the effect of PhB observed in the present study are certainly mainly direct effects. They might by partly mediated by a transient hypothyroidism, although only from the 14th postnatal day, but are certainly not significantly mediated through hypothermia, undernutrition or changes in maternal care.

The relevance of the results of these studies to the clinical use of PhB should be questioned. PhB is the most commonly used anticonvulsant drug for treatment of infant seizures or for prevention of convulsive disorders after hypoxic events. But, even if doses given to children are much lower than those used in the present study, peak serum levels reached in infants are close to those found in the present study or in other animal studies[6]. The human brain growth spurt has been estimated to occur from mid-pregnancy through to the 18th month of postnatal life[7], at a moment when PhB treatment is commonly administered to neonates, even over the whole considered period.

In conclusion, it appears from the present study that an early PhB treatment induces a reduction and a retardation in active glucose utilization by the developing rat brain. However, cerebral amino acid concentration is not significantly different in saline- and PhB-treated animals, raising the question of a possible alternate substrate source for brain amino acid biosynthesis. In this respect, the rate of β-hydroxybutyrate utilization by the brain of saline- and PhB-treated animals will be studied in the following paper.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are very grateful to Professor J. Robert for allowing the free determination of thyroid hormone levels in his laboratory, to Dr. Y. Badonnel for allowing free determination of glucose and PhB in his laboratory and for his help in amino acid separation. Thanks are due to Mrs. Lefevre for performing amino acid analysis. The authors wish to thank S. Gesnel for excellent technical assistance, P. Michel for animal treatment and L. Gouret for editorial assistance. This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U. 272) and from the Fondation pour la Recherche Médicale.

REFERENCES

1 Agrawal, H.C., Davis, J.M. and Himwich, W.A., Postnatal changes in free amino acid pool of rat brain, *J. Neurochem.*, 13 (1966) 607–615.
2 Balázs, R., Cocks, W.A., Eayrs, J.J. and Kovacs, S., Biochemical effects of thyroid hormones on brain. In M. Hamburgh and E.J.W. Barrington (Eds.), *Hormones in Development*, Appleton-Century-Croft, New York, 1971, pp. 357–379.
3 Cocks, J.A., Balázs, R., Johnson, A.L. and Eayrs, J.T., Effect of thyroid hormone on biochemical maturation of rat brain: conversion of glucose-carbon into amino acids, *J. Neurochem.*, 17 (1970) 1275–1285.
4 Cragg, B.G., Synapses and membranous bodies in experimental hypothyroidism, *Brain Res.*, 18 (1970) 297–307.
5 Cutler, R.W.P. and Dudzinski, D.S., Effect of pentobarbital on uptake and release of [^{3}H]GABA and [^{14}C]glutamate by brain slices, *Brain Res.*, 67 (1974) 546–548.
6 Diaz, J., Schain, R.J. and Bailey, B.G., Phenobarbital-induced brain growth retardation in artificially reared rat pups, *Biol. Neonate*, 32 (1977) 77–82.
7 Dobbing, J., The later development of the brain and its vulnerability. In E. Davis (Ed.), *Scientific Foundations of Paediatrics*, Heinemann, London, 1974, pp. 565–577.
8 Dobbing, J. and Sands, J., Quantitative growth and development of human brain, *Arch. Dis. Child*, 48 (1973) 757–767.
9 Dravid, A.R. and Jilek, L., Influence of stagnant hypoxia (oligaemia) on some free amino acids in rat brain during ontogeny, *J. Neurochem.*, 12 (1965) 837–843.
10 Dubois, J.D. and Dussault, J.H., Ontogenesis of thyroid-function in the neonatal rat. Thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) production rates, *Endocrinology*, 101 (1977) 435–441.
11 Fishman, R.H.B., Gaathon, A. and Yanai, J., Early barbiturate treatment eliminates peak serum thyroxine levels in neonatal mice and produces ultrastructural damage in the brains of adults, *Dev. Brain Res.*, 5 (1982) 202–205.
12 Flexner, L.B., The development of the cerebral cortex: a cytological functional and biochemical approach, *Harvey Lectures*, Series XLVII, (1951–1952) 156–179.

13 Friedman, M.B., Erickson, C.K. and Leslie, S.W., Effects of acute and chronic ethanol administration on whole mouse synaptosomal calcium influx, *Biochem. Pharmacol.*, 29 (1980) 1903–1908.
14 Gaitonde, M.K., Dahl, D.R. and Elliott, K.A.C., Entry of glucose carbon into amino acids of rat brain and liver in vivo after injection of uniformly ^{14}C-labelled glucose, *Biochem. J.*, 94 (1965) 345–352.
15 Gaitonde, M.K. and Richter, D., Changes with age in the utilization of glucose carbon in liver and brain, *J. Neurochem.*, 13 (1966) 1309–1318.
16 Hamburgh, M., An analysis of thyroid hormone on development based on in vivo and in vitro studies, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 10 (1968) 198–213.
17 Hamburgh, M. and Flexner, L.B., Biochemical and physiological differentiation during morphogenesis. XXI. Effect of hypothyroidism and hormone therapy on enzyme activities of the developing cerebral cortex of the rat, *J. Neurochem.*, 1 (1957) 279–288.
18 Jolley, M.E., Stroupe, S.D., Schwenzer, K.S., Wang, C.J., Lu-Steffes, M., Hill, H.D., Popelka, S.R., Holen, J.T. and Kelso, D.M., Fluorescence polarization immunoassay. III. An automated system, *Clin. Chem.*, 27 (1981) 1575–1579.
19 LaManna, J.C., Cordingley, G. and Rosenthal, M., Phenobarbital actions in vivo: effects on extracellular potassium activity and oxidative metabolism in cat cerebral cortex, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 200 (1977) 560–569.
20 Legrand, J., Analyse de l'action morphogénétique des hormones thyroïdiennes sur the cervelet du jeune rat, *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.*, 56 (1967) 205–244.
21 Leslie, S.W., Friedman, M.B., Wilcox, R.E. and Elrod, S.V., Acute and chronic effects of barbiturates on depolarization-induced calcium influx into rat synaptosomes, *Brain Res.*, 185 (1980) 409–417.
22 Lindeberg, E.G.G., Use of *o*-phtalaldehyde for detection of amino acids and peptides on thin-layer chromatograms, *J. Chromatogr.*, 117 (1976) 439–441.
23 Lu-Steffes, M., Pittluck, G.W., Jolley, M.E., Panas, H.N., Olive, D.N., Wang, C.H., Nystrom, D.D., Klegan, C.L., Davis, T.P. and Stroupe, S.D., Fluorescence polarization immunoassay. IV. Determination of phenytoin and phenobarbital in human serum and plasma, *Clin. Chem.*, 28 (1982) 2278–2282.
24 Midgley, J.E.M. and Wilkins, T.A., An improved method for the estimation of relative binding constants of T4 and its analogues with serum proteins, *Clin. Endocrinol.*, 17 (1982) 523–528.
25 Möhler, H.P., Patel, A.J. and Balázs, R., Effect of 1-hydroxy-3-aminopyrrolidone-2 and other CNS depressants on metabolic compartmentation in the brain. In S. Berl, D.D. Clarke and D. Schneider (Eds.), *Metabolic Compartmentation and Neurotransmission. Relation to Brain Structure and Function*, Plenum, New York, 1975, pp. 385–395.
26 Nicholson, J.L. and Altman, J., The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of rat cerebellar cortex. I. Cell proliferation and differentiation, *Brain Res.*, 44 (1972) 13–23.
27 Patel, A.J. and Balázs, R., Factors affecting the development of metabolic compartmentation in the brain. In S. Berl, D.D. Clarke and D. Schneider (Eds.), *Metabolic Compartmentation and Neurotransmission. Relation to Brain Structure and Function*, Plenum, New York, 1975, pp. 363–383.
28 Patel, A.J. and Rabié, A., Thyroid deficiency and cell death in rat cerebellum during development, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 6 (1980) 45–49.
29 Pysh, J.J., Perkins, R.E. and Singer-Beck, L., The effect of postnatal undernutrition on the development of the mouse Purkinje cell dendritic tree, *Brain Res.*, 163 (1979) 165–170.
30 Quastel, J.H., Effects of drugs on the metabolism of brain in vivo, *Br. Med. Bull.*, 21 (1965) 49–56.
31 Ramirez de Guglielmone, A.E. and Gomez, C.J., Influence of neonatal hypothyroidism on amino acids in developing rat brain, *J. Neurochem.*, 13 (1966) 1017–1025.
32 Roberts, S. and Morelos, B.S., Regulation of cerebral metabolism of amino acids. IV. Influence of amino acid levels on leucine uptake, utilization and incorporation into protein in vivo, *J. Neurochem.*, 12 (1965) 373–387.
33 Schain, R.J. and Watanabe, K., Effect of chronic phenobarbital administration upon brain growth of the infant rat, *Exp. Neurol.*, 47 (1975) 509–515.
34 Strang, R.H.C. and Bachelard, H.S., Rates of cerebral glucose utilization in rats anesthetized with phenobarbitone, *J. Neurochem.*, 20 (1973) 987–994.
35 Walravens, S.P. and Chase, H.P., Influence of thyroid on formation of myelin lipids, *J. Neurochem.*, 16 (1969) 1477–1484.
36 Winick, M., Malnutrition and brain development, *J. Pediatr.*, 74 (1969) 667–679.
37 Yaffe, S.J. and Catz, C.S., Pharmacology of the perinatal period, *Clin. Obstet. Gynecol.*, 14 (1971) 722–744.
38 Yanai, J., Comparison of early barbiturate and ethanol effects on the CNS, *Substance and Alcohol Actions/Misuse*, 2 (1981) 79–91.
39 Yanai, J., An animal model for the effect of barbiturate on the development of the central nervous system. In J. Yanai (Ed.) *Neurobehavioral Teratology*, Elsevier, Amsterdam, 1984, pp. 111–132.
40 Yanai, J. and Bergman, A., Neuronal deficits after neonatal exposure to phenobarbital, *Exp. Neurol.*, 73 (1981) 199–208.
41 Yanai, J., Bergman, A., Shafer, R., Yedwab, G., and Tabakoff, B., Audiogenic seizures and neuronal deficits following early exposure to barbiturate, *Dev. Neurosci.*, 4 (1981) 345–350.
42 Yanai, J. and Iser, C., Stereologic study on Purkinje cells in mice following early exposure to phenobarbital, *Exp. Neurol.*, 74 (1981) 707–716.
43 Yanai, J., Rosselini-Austin, L. and Tabakoff, B., Neuronal deficits in mice following prenatal exposure to phenobarbital, *Exp. Neurol.*, 64 (1979) 237–244.
44 Yeung, C.Y., Glasg, D.C.H., Tam, L.S., Chan, A. and Lee, K.H., Phenobarbitone prophylaxis for neonatal hyperbilirubinemia, *Pediatrics*, 48 (1971) 372–376.

MEMOIRE B

Developmental Brain Research, 36 (1987) 231–236
Elsevier

BRD 50621

Effects of early chronic phenobarbital treatment on the maturation of energy metabolism in the developing rat brain. II. Incorporation of β-hydroxybutyrate into amino acids

Anne Pereira de Vasconcelos, Henri Schroeder and Astrid Nehlig

INSERM U. 272, Pathologie et Biologie du Développement Humain, Université de Nancy I, Nancy (France)

(Accepted 24 March 1987)

Key words: Energy metabolism; Ketone body; Amino acid; Developing rat brain; Phenobarbital; Barbiturate; Chronic treatment

The influence of phenobarbital (PhB) on the utilization of β-hydroxybutyrate by the cerebral cortex and the cerebellum was studied in rats during postnatal maturation. The animals were treated from day 2 to day 35 after birth either by a daily injection of 50 mg/kg PhB or by saline. The rats were studied at 5 postnatal stages: 7, 10, 14, 21 and 35 days. Plasma β-hydroxybutyrate and acetoacetate levels reached their peak values between 10 and 14 days after birth. The concentration of both ketone bodies was significantly higher in PhB- than in saline-treated rats between 10 and 35 days after birth. The total incorporation of [3-^{14}C]β-hydroxybutyrate into amino acids reached a peak value at 14 days after birth and was down to very low values at 35 days. It was higher in PhB- than in saline-treated rats. The specific radioactivity values of glutamate, glutamine, aspartate and GABA were significantly higher in PhB- than in saline-treated especially at 10 days after birth. These results demonstrate that a PhB treatment induces an increase in brain ketone body utilization in neonate rats, which is likely to balance the decrease in brain glucose utilization induced by this pharmacological treatment.

INTRODUCTION

β-Hydroxybutyrate (βHB) and acetoacetate (ACA) have been shown to be alternate substrates to glucose for brain energy metabolism[7] and for amino acid[2,3] and lipid biosynthesis[13,21]. The cerebral extraction of ketone bodies is related to their arterial concentration but is dependent on the age of the animal[7,10]. Indeed, in 16- to 22-day-old suckling rats, the cerebral arteriovenous differences of ketone bodies are about 3–4 times greater than in adult rats at the same blood ketone body concentration[7] and, in most species, arteriovenous differences of βHB plus ACA are comparable to or even greater than the values for glucose[1]. In fact, the total oxidation of the extracted ketone bodies can account for 25–75% of the calculated cerebral oxygen consumption in suckling rats[7]. Similarly, newborn and infant humans are able to remove and oxidize ketone bodies at a rate of 5 and 4 times higher, respectively, as compared to adult humans at the same arterial ketone body concentrations[10]. βHB has also been shown to be, as a precursor, more effective than glucose for amino acid biosynthesis in immature rat[2,3] and mouse brains[19].

An early chronic phenobarbital (PhB) treatment has been shown to induce a transient decrease in the levels of circulating free thyroxin (T4) and a retardation in glucose incorporation into amino acids[14], but causes no change in cerebral amino acid concentration. The aim of the present study is to determine whether an early chronic PhB treatment can influence the rate of incorporation of βHB into cerebral amino acids and if this biochemical pathway can balance the retardation of glucose incorporation into amino acids.

Correspondence: A. Pereira de Vasconcelos, INSERM U. 272, Pathologie et Biologie du Développement Humain (Dir. P. Vert), Université de Nancy I, 30, rue Lionnois, B.P. 3137, 54013 Nancy Cédex, France.

0165-3806/87/$03.50 © 1987 Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division)

MATERIALS AND METHODS

Animals and pharmacological treatment

Adult Sprague–Dawley rats, 1 male and 2 females, were housed together in mating groups for 5 days and constantly maintained under standard laboratory conditions on a 12:12 h light/dark cycle (lights on at 06.00 h). Food and water were available ad libitum. After delivery, litter sizes were reduced to 12 pups. Sodium phenobarbital (5-ethyl-5-phenylbarbituric acid, sodium salt, Fluka, Buchs, Switzerland), dissolved in saline, was administered subcutaneously to the pups from day 2 to day 35 after birth, daily, at a dose of 50 mg/kg. Control animals received the same volume of saline. The animals received their daily injection between 08.00 and 09.00 h, and the blood and tissue samples for the studies were taken about 3 h later between 10.30 and 11.00 h. The animals were studied at 5 developmental stages, at 7, 10, 14, 21 and 35 days after birth, respectively.

Plasma βHB and ACA measurement

Total blood was collected into a preheparinized glass dish after decapitation of the rats and deproteinized by chilled 10% (v/v) perchloric acid and centrifuged at 3000 *g* for 15 min at 2 °C. The supernatant solution, previously neutralized by 20% KOH, was used for enzymatic and spectrophotometric determination of ACA[11] and βHB[20], by means of a Bausch and Lomb spectrophotometer, model Spectronic 2000 (Bausch and Lomb, Analytical Systems Division, Rochester, NY). For these two dosages, blood samples from 5 animals were mixed at 7 days, blood from 3 rats was pooled at 10, 14 and 21 days after birth and the blood from one single animal was used at 35 days.

Administration of [3-^{14}C]βHB

Control and PhB-treated animals received an intraperitoneal injection of 7–10 μCi/100 g body wt. of [3-^{14}C]βHB (spec. act. 45–55 mCi/mmol; New England Nuclear, Boston, MA). At 30 min after the administration of [3-^{14}C]βHB, the animals were killed by decapitation followed by immediate immersion of the head into liquid nitrogen at the stages of 21 and 35 days, or by immersion of the whole body into liquid nitrogen at the stages of 7, 10 and 14 days. Thereafter, the heads were kept at −80 °C.

Treatment of the tissues

The brains were dissected out into two parts, the cerebral cortex and the cerebellum in a cold room at 2 °C. The tissue was weighed and dispersed in perchloric acid, as previously described[14]. The brain acid soluble extract was passed through a cation-exchange resin (Amberlite IRN-77, H^+ form). The amino acids adsorbed on Amberlite IRN-77 resin were eluted with 3 N NH_4OH. The effluent of the column was evaporated until dry in a rotating evaporator under vacuum at 40 °C. The residue was dissolved in a determined volume of 10% isopropanol.

Treatment of the amino acid fraction

The radioactivity of the different amino acids was determined after a bidimensional separation on thin-layer chromatography and counting in a Beckman scintillation counter, model LS 1801, as previously described[14].

Statistical analysis

For statistical analysis, Student's *t*-test was applied to differences between the values obtained in saline- and PhB-treated animals.

TABLE I

Influence of PhB on plasma β-hydroxybutyrate and acetoacetate concentrations

Values, expressed as μmol/ml, are means ±S.D. of the number of animals in parentheses.

Age of the animals (days)	*β-Hydroxybutyrate*		*Acetoacetate*	
	Control animals	*PhB-treated animals*	*Control animals*	*PhB-treated animals*
7	1.28 ± 0.27 (6)	1.14 ± 0.18 (6)	0.45 ± 0.07 (7)	0.40 ± 0.06 (6)
10	1.04 ± 0.24 (6)	1.43 ± 0.28 (4)**	0.33 ± 0.04 (7)	0.42 ± 0.07 (5)*
14	1.09 ± 0.24 (5)	2.17 ± 0.35 (5)**	0.31 ± 0.02 (5)	0.44 ± 0.04 (5)**
21	0.29 ± 0.09 (4)	0.49 ± 0.17 (4)**	0.13 ± 0.04 (5)	0.20 ± 0.06 (5)*
35	0.15 ± 0.02 (6)	0.27 ± 0.05 (4)**	0.10 ± 0.02 (8)	0.11 ± 0.03 (5)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, statistically significant differences between control and PhB-treated animals.

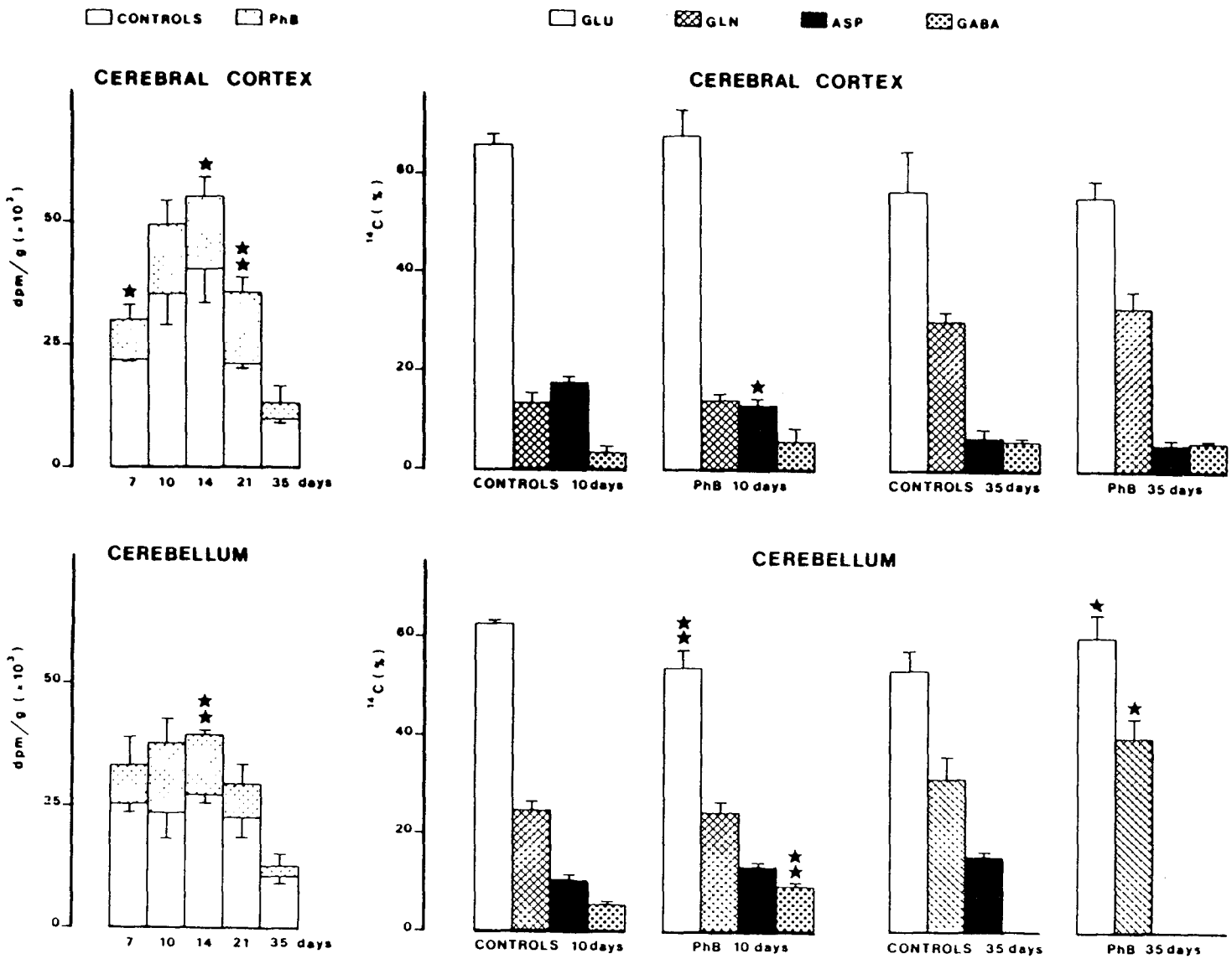


Fig. 1. Influence of PhB on postnatal evolution of the total radioactivity of amino acids, expressed as dpm/g (left part of the figure) and of the distribution of ^{14}C (%) between the different amino acids (right part of the figure) in the cerebral cortex and the cerebellum of the rat. Values are means ± S.D. of 3-4 experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, statistically significant differences between saline- and PhB-treated animals. GLU, glutamate; GLN, glutamine; ASP, aspartate.

RESULTS

Plasma βHB and ACA concentrations

As shown in Table I, at 7 days after birth, there was no significant difference between the concentrations of both ketone bodies in saline- and PhB-treated animals. Between 10 and 35 days after birth, βHB concentrations were significantly higher at all stages in PhB- than in saline-treated rats, by 38% at 10 days and 69–99% between 14 and 35 days. The influence of the barbiturate treatment was the same on ACA plasma levels. The latter were significantly increased by 27% at 10 days and by 42 and 54% at 14 and 21 days respectively in PhB-treated rats over control values. However, ACA levels were identical in both groups at 35 days after birth.

Distribution of radioactivity between the different amino acids

As shown in Fig. 1, the sum of the radioactivities of the 4 studied amino acids (glutamate, glutamine, aspartate and GABA), expressed as dpm/g of tissue, increased in both structures between day 7 and day 14 after birth and decreased at the latter stages of postnatal development. The total incorporation of [3-^{14}C]βHB into these amino acids was higher in both structures and at all studied stages in PhB- than in saline-treated rats. The distribution of radioactivity between the 4 different amino acids in the cerebral cortex was the same in saline- and PhB-treated rats, except for aspartate at 10 days. The percentage of radioactivity in glutamate was lower by about 10% at 35 days than at 10 days. The labeling in glutamine and aspartate was about 15% for each amino acid at 10 days after birth, whereas the one in glutamine reached a value of about 30–35% at 35 days after birth. The percentage of radioactivity in aspartate and GABA was low at 35 days, about 5%.

In the cerebellum, the percentage of radioactivity in glutamate was significantly lower at 10 days in PhB- than in saline-treated rats and the reverse was true at 35 days after birth. The percentage of labeling in glutamine increased with development, reaching about 22% at 10 days vs 32–40% at 35 days after birth. In addition there was no measurable incorporation of [3-^{14}C]βHB into cerebellar GABA in 35-day-old control rats and into cerebellar aspartate and GABA in 35-day-old PhB-treated rats.

Specific radioactivities of amino acids

As shown in Table II, specific radioactivity values decreased between 10 and 35 days after birth for both studied structures and pharmacological treatments. The specific radioactivities of the 4 different amino acids were significantly higher in PhB- than in saline-treated rats at 10 days in both the cerebral cortex and the cerebellum. At 35 days after birth, except for cortical glutamine, there was no significant difference between specific radioactivity values in saline- and PhB-treated rats. The specific radioactivity values of glutamine relative to glutamate (RSR) did not change with the nature of the pharmacological treat-

TABLE II

Specific radioactivities of amino acids in the cerebral cortex and the cerebellum of saline- and PhB-treated 10- and 35-day-old rats

Values, expressed as dpm/μmol of amino acid, are means ±S.D. of 3–4 experiments. The specific radioactivity of each amino acid relative to glutamate is indicated in parentheses.

	Cerebral cortex				*Cerebellum*			
	10		*35*		*10*		*35*	
	Saline	*PhB*	*Saline*	*PhB*	*Saline*	*PhB*	*Saline*	*PhB*
Glutamate	5075 ± 507	8330 ± 1800*	587 ± 133	872 ± 180	5487 ± 922	6902 ± 1076	882 ± 138	987 ± 144
Glutamine	1476 ± 334	2580 ± 155**	571 ± 26	961 ± 105**	2619 ±547	3492 ± 345	836 ± 47	1035 ± 146
	(0.29)	(0.31)	(0.97)	(1.20)	(0.48)	(0.51)	(0.95)	(1.05)
Aspartate	3095 ± 543	4141 ± 365*	306 ± 116	301 ± 83	2314 ± 575	4830 ± 494**	1262 ± 112	1314 ± 145
	(0.61)	(0.50)	(0.52)	(0.35)	(0.42)	(0.70)	(1.43)	(1.33)
GABA	1050 ± 178	2594 ± 542**	304 ± 108	608 ± 140*	2258 ± 452	5010 ± 391**	–	–
	(0.21)	(0.31)	(0.52)	(0.70)	(0.41)	(0.73)		

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, statistically significant differences between saline- and PhB-treated animals.

ment. For aspartate and GABA, they were lower in PhB-treated animals than in controls in cerebral cortex and the reverse was true in the cerebellum of 10-day-old rats.

DISCUSSION

The results of the present study show that βHB seems to be a more efficient precursor for amino acid biosynthesis in PhB- than in saline-treated rats. The total incorporation of [3-^{14}C]βHB into amino acids of control rats shows a peak at 14 days after birth and decreases thereafter to become very low at 35 days after birth (Fig. 1). The postnatal evolution of this biochemical pathway is in good agreement with previous data showing that βHB is a more efficient precursor for amino acid biosynthesis in immature than in mature rat brain[3]. In PhB-treated rats, the total incorporation of [3-^{14}C]βHB into amino acids exhibits the same postnatal evolution as in saline-treated rats, but reaches higher values at all studied stages and in both structures (Fig. 1). This difference in the efficiency of βHB, as a precursor for brain amino acid biosynthesis in saline- and PhB-treated animals, translates into higher values of specific radioactivity of cerebral amino acids in 10-day-old PhB-treated rats. As previously shown for the incorporation of glucose carbon into amino acids[14], PhB treatment induces more important changes in the distribution of ^{14}C from [3-^{14}C]βHB into amino acids in the cerebellum than in the cerebral cortex, confirming the greater vulnerability of the former structure.

At 35 days after birth, βHB appears to be a much less effective precursor for brain amino acid biosynthesis than at earlier stages of postnatal development, as shown by the lower values of total radioactivity and of specific radioactivity of amino acids.

The more efficient conversion of [3-^{14}C]βHB into amino acids in PhB- than in saline-treated rats is certainly the result of the significantly higher ketone body concentration in the blood of these animals. It is well known that ketone bodies are taken up by the immature brain at a rate linearly related to their arterial concentration[6,10]. βHB and ACA are synthetized in the liver by degradation of free fatty acids, which are present at high concentrations in the blood of infant rats, as a result of the high lipid content of maternal milk[4,6]. The significantly higher concentration of ketone bodies in the blood of PhB-treated animals certainly reflects their higher rate of biosynthesis in the liver, which can be due either to an increased flow of substrates through this metabolic pathway itself or to an induction of the activity of the enzymes catalyzing the degradation of fatty acids in the liver. PhB has indeed been shown to be an effective inducer of hepatic microsomal enzymes[8,12,18].

In conclusion, it arises from the present study that ketone bodies are used to a greater extent by the brain in PhB- than in saline-treated animals. Glucose utilization has been shown to be inhibited by ketone bodies in the brain[9,17]. The decrease in glucose utilization shown in the previous study[14] may be either a direct effect of PhB on cerebral glucose utilization and amino acid biosynthesis pathways or the result of an increase by PhB of ketone body supply to and/or utilization by the brain. Thus, the enhanced rate of ketone body utilization by the brain of PhB-treated animals may act as a balance mechanism to the decreased glucose utilization by the brains of these rats, and partly account for the lack of difference between amino acid concentrations in the cerebral cortex and the cerebellum of saline- and PhB-treated rats.

The critical question arising from the present study is whether developing brain can have a wide enough choice in substrate supply such that glucose and ketone bodies may be used interchangeably in meeting the metabolic needs of respiration, energy metabolism and myelinogenesis without long-term effects on cerebral function. In this respect, an early chronic PhB treatment has been shown to induce long-term behavioral disturbances in rodents. So the possibility that early PhB treatment could influence the maturation of some brain mechanisms as a result of the relative imbalance between glucose and ketone bodies supply to the brain during the neonatal period remains to be elucidated[5,15,16].

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are very grateful to S. Gesnel for excellent technical assistance, to P. Michel for animal treatment and to L. Gouret for editorial assistance. This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U. 272) and from the Fondation pour la Recherche Médicale.

REFERENCES

1 Cremer, J.E., Substrate utilization and brain development, *J. Cerebr. Blood Flow Metabol.*, 2 (1982) 394–407.
2 De Vivo, D.C., Leckie, M.P. and Agrawal, H.C., The differential incorporation of β-hydroxybutyrate and glucose into brain glutamate in the newborn rat, *Brain Res.*, 55 (1973) 485–490.
3 De Vivo, D.C., Leckie, M.P. and Agrawal, H.C., D-β-Hydroxybutyrate: a major precursor of amino acids in developing rat brain, *J. Neurochem.*, 25 (1975) 161–170.
4 Dymsza, H.A., Czajka, D.M. and Miller, S.A., Influence of artificial diet on weight gain and body composition of the neonatal rat, *J. Nutr.*, 84 (1964) 100–106.
5 Fonseca, N.M., Bell, A.B. and Carlini, E.A., Differential behavioral responses of male and female adult rats treated with five psychotropic drugs in the neonatal stage, *Psychopharmacologia*, 46 (1976) 263–268.
6 Girard, J. and Ferré, P., Metabolic and hormonal changes around birth. In C.T. Jones (Ed.), *Biochemical Development of the Fetus and Neonate*, Elsevier, Amsterdam, 1982, pp. 517–551.
7 Hawkins, R.A., Williamson, D.H. and Krebs, H.A., Ketone-body utilization by adult and suckling rat brain in vivo, *Biochem. J.*, 122 (1971) 13–18.
8 Ioannides, C. and Parke, D.V., Mechanism of induction of hepatic microsomal drug metabolizing enzymes by a series of barbiturates, *J. Pharm. Pharmacol.*, 27 (1975) 739–746.
9 Itoh, T. and Quastel, J.H., Acetoacetate metabolism in infant and adult rat brain in vitro, *Biochem. J.*, 116 (1970) 641–655.
10 Kraus, H., Schlenker, S. and Schwedesky, D., Developmental changes of cerebral ketone body utilization in human infants, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 355 (1974) 164–170.
11 Mellanby, J. and Williamson, D.H., Acetoacetate. In H.U. Bergmeyer and K. Gawehn (Eds.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic, New York, 1974, Vol. 4, pp. 1840–1843.
12 Parke, D.V., The responsiveness of cells to various drug inducers. In R.W. Estabrook and E. Lindenlaub (Eds.), *The Induction of Drug Metabolism*, Schattauer, Stuttgart, pp. 101–111.
13 Patel, M.S. and Owen, O.E., Development and regulation of lipid synthesis from ketone bodies by rat brain, *J. Neurochem.*, 28 (1977) 109–114.
14 Pereira de Vasconcelos, A. and Nehlig, A., Effects of early chronic phenobarbital treatment on the maturation of energy metabolism in the developing rat brain. I. Incorporation of glucose carbon into amino acids, *Dev. Brain Res.*, 36 (1987) 219–229.
15 Pick, C.G. and Yanai, J., Long-term reduction in spontaneous alternations after early exposure to phenobarbital, *Int. J. Dev. Neurosci.*, 2 (1984) 223–228.
16 Pick, C.G. and Yanai, J., Long-term reduction in eight-arm maze performance after early exposure to phenobarbital, *Int. J. Dev. Neurosci.*, 3 (1985) 223–227.
17 Ruderman, N.B., Ross, P.S., Berger, M. and Goodman, M.N., Regulation of glucose and ketone-body metabolism in brain of anesthetized rats, *Biochem. J.*, 138 (1974) 1–10.
18 Valerino, D.M., Vessel, E.S., Aurori, K.C. and Johnson, A.O., Effects of various barbiturates on hepatic microsomal enzymes. A comparative study, *Drug Metabol. Disp.*, 2 (1974) 448–454.
19 Van Den Berg, C.J. and Ronda, G., Metabolism of glutamate and related amino acids in the 10-day-old mouse brain: experiments with labelled acetate and β-hydroxybutyrate, *J. Neurochem.*, 27 (1976) 1449–1453.
20 Williamson, D.H. and Mellanby, J., D-(−)-3-Hydroxybutyrate. In H.U. Bergmeyer and K. Gawehn (Eds.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic, New York, 1974, Vol. 4, pp. 1836–1839.
21 Yeh, Y.Y., Streuli, V.L. and Zee, P., Ketone bodies serve as important precursors of brain lipids in the developing rat, *Lipids*, 12 (1977) 957–964.

MEMOIRE C

In : Neonatal Seizures : Pathophysiology
and Pharmacological Management,
Vert P., Wasterlain C., Eds., Raven
Press, New York, 1990, sous presse

EFFECTS OF PHENOBARBITAL ON ENERGY METABOLISM IN THE DEVELOPING BRAIN

Astrid NEHLIG*, Anne PEREIRA DE VASCONCELOS
and Paul VERT

INSERM U. 272
Université de Nancy I
30 rue Lionnois
54013 NANCY
FRANCE

Running title : Phenobarbital and brain energy metabolism

* To whom correspondance should be addressed

SUMMARY

The influence of postnatal phenobarbital (PhB) treatment on the biosynthesis of cerebral amino acids from [2-^{14}C]glucose and [3-^{14}C] ß-hydroxybutyrate was studied in rats during postnatal development. The animals were treated from day 2 to day 35 after birth by a daily injection of 50 mg/kg PhB or by saline. The rats were studied at 5 postnatal stages : 7, 10, 14, 21 and 35 days. PhB treatment induced a decrease in the circulating levels of glucose and an increase in the blood concentrations of ketone bodies. Amino acid levels in the cerebral cortex, subcortical areas and cerebellum were not greatly affected by the pharmacological treatment. However, the rate of conversion of glucose carbon into amino acids was significantly reduced by PhB in the three brain areas studied, whereas the one of ß-hydroxybutyrate was increased in PhB-treated as compared to control animals. Specific radioactivity values of amino acids from [2-^{14}C]glucose were lower in PhB- than in saline-treated rats in the three brain areas studied and the reverse was true when [3-^{14}C]ß-hydroxybutyrate was the precursor of cerebral amino acids. The results of the present study show that an early chronic PhB treatment is able to induce a shift in the cerebral energy balance without affecting the tissue amino acid concentrations demonstrating the high adaptability of the developing animal.

INTRODUCTION

Phenobarbital (PhB) is an anticonvulsant drug largely administered to neonates, especially for the prevention and treatment of convulsive seizures. The early administration of PhB to mice has been shown to induce a decrease in body and brain weight (21). This growth retardation also translates into long-lasting cellular destructions in the brain, especially at the level of cerebellar Purkinje cells and hippocampal pyramidal cells (25-28). However the effects of an early barbiturate treatment on the metabolism of the developing brain have not been extensively studied.

The fundamental characteristic of energy metabolism in the mature brain is the fast and active incorporation of glucose carbon into amino acids. This metabolic pathway sharply develops between day 10 and 15 after birth in the rat (8), at the time when the cerebral cortex becomes functionally mature (7).

In the brain of newborn and immature humans and animals, ß-hydroxybutyrate (ßHB) and acetoacetate (AcA) have been shown to act as alternate substrates for brain energy metabolism (11,13) and for amino acid (3,4) and lipid biosynthesis (17,29).

In the present paper, we will consider the influence of an early chronic phenobarbital treatment on amino acid concentration and on the incorporation of radioactive glucose and ßHB into amino acids of the developing rat brain.

MATERIALS AND METHODS

Animals and pharmacological treatment

Sprague-Dawley rat pups obtained from the laboratory breeding received a daily subcutaneous injection of sodium phenobarbital dissolved in saline from postnatal day 2 to day 35 at a dose of 50 mg/kg. Control animals were injected with the same volume of saline. The animals were studied at 5 developmental stages, at 7, 10, 14, 21 and 35 days after birth, respectively.

Plasma phenobarbital, glucose and ketone body measurement

Plasma PhB levels were measured by radiative energy attenuation applied to fluorescence polarization immunoassay by means of a TDX analyzer, according to the method described by Jolley et al. (12) and Lu-Steffes et al. (14). Plasma glucose concentration was determined by means of a Hitachi analyzer, model 705. Blood levels of ßHB and AcA were measured by classical enzymatic spectrophotometric methods (15,24).

Administration of radioactive precursors

Control and PhB-treated animals received an intraperitoneal injection of 7-10 µCi/100g body weight of [2-^{14}C]glucose or of [3-^{14}C] ßHB. The animals were returned to their normal environment,

back to their mother for suckling animals, and allowed food and water ad libitum. At 30 min after the administration of the radioactive tracer, the animals were killed by decapitation followed by immediate immersion of the head into liquid nitrogen at 21 and 35 days, or by immersion of the whole body into liquid nitrogen at the stages of 7, 10 and 14 days. Thereafter, the heads were kept at -80°C.

Treatment of the tissues and separation of amino acids

The brains were dissected out into three parts, the cerebral cortex, subcortical areas and cerebellum in a cold room at 2°C. The tissue was dispersed in 6 % (v/v) perchloric acid by means of an ultra-turrax The suspension was centrifuged at 3000 g for 15 min at 2°C and the supernatant was neutralized by 2N KOH. After precipitation of all K-perchlorate and centrifugation, the supernatant solutions were passed through a cation-exchange resin (Amberlite IRN-77, H^+ form). The amino acids adsorbed on this resin were eluted with 3N NH_4OH and the eluate was dried up and treated as previously described (18,19). The concentration of the different amino acids of cerebral extracts was determined by means of an amino acid analyzer LKB. The radioactivity of the individual amino acids was measured after a bidimensional separation on thin-layer chromatography, as previously described (18). For the determination of the specific radioactivity values of each amino acid, two aliquots of the same sample were used for the determination of concentration and radioactivity levels of the considered amino acid.

RESULTS AND DISCUSSION

Plasma phenobarbital, glucose and ketone body concentrations

Plasma PhB levels increased between day 7 and 14, and then were reduced by two-fold between 14 and 35 days after birth, as shown in Table I. These plasma concentrations are close to high levels in the therapeutic range found in neonates (2,9). The postnatal evolution of blood glucose and ketone body concentration in control rats was similar to that previously described (4,11) but exhibited a different pattern in saline- and PhB-treated rats (Fig. 1). The early chronic PhB treatment induced a decrease in plasma glucose concentration, significant between 10 and 21 days and a simultaneous increase in ßHB and AcA levels. In control animals, the blood concentration of both ketone bodies was highest at 7 days and decreased throughout the whole studied period, whereas in PhB-treated animals, ßHB and AcA blood levels reached a peak at 14 days after birth.

Brain amino acid concentration

The concentrations of glutamate, glutamine, aspartate and GABA in the cerebral cortex, subcortical areas and cerebellum reached at 7 days a value of about 35-70 % of their respective levels at 35 days (Fig 2). In the three studied structures, the levels of glutamate, glutamine and GABA regularly increased over the whole considered period, whereas tissue aspartate contents reached a peak value at 21 days. The levels of glutamate, glutamine and aspartate were usually highest

in the cerebral cortex and lowest in the cerebellum. Conversely, GABA concentrations were highest in subcortical areas and lowest in cerebellum. This postnatal evolution of brain amino acid concentration confirms previous data (1,6,23).

The concentration of the four cerebral amino acids was not widely modified by an early chronic PhB treatment (Fig 2). Decreases in some amino acid concentrations could be noticed in the cerebral cortex, especially at 14 days, and in subcortical areas, mainly at 35 days. However there was no significant difference in amino acid concentration in the cerebellum, whether the rats had been treated by saline or PhB.

Conversion of carbon glucose into amino acids

As shown in Fig. 3, the rate of conversion of carbon glucose into amino acids was low at the beginning of postnatal development, i.e. at 7 and 10 days. The efficiency of this metabolic pathway started to increase at 14 days and reached its adult level at 21 days in the three brain areas studied, as previously described (8). There appeared to be some delay in the maturation of this biochemical pathway in the cerebellum, which is a phylogenetically less mature brain structure, as compared to the two other ones. The efficiency of the conversion of glucose carbon into amino acids was lowered in the three brain areas studied, especially from day 14 after birth in PhB- as compared to saline-treated animals. The decrease in the rate of this biochemical pathway induced by PhB also translated into a general decrease in the values of specific radioactivity of the amino acids in the cerebral

cortex and cerebellum, whereas specific radioactivity values did not seem to be affected or were even increased in subcortical areas (Table 2).

Conversion of ß-hydroxybutyrate into amino acids

The postnatal evolution of the radioactivity of [3- ^{14}C] ßHB incorporated into amino acids, represented in Fig. 4, confirms previous data showing that ßHB is a more efficient precursor for amino acid biosynthesis in immature than in mature brain (3,4). The rate of incorporation of ßHB into amino acids was lower in cerebellum than in the two other brain areas. An early chronic PhB treatment induced an increase in the radioactivity of the amino acid fraction in the three cerebral structures and at all studied stages. This increase in the efficiency of ßHB as a precursor for cerebral amino acid biosynthesis translated into higher values of specific radioactivity in PhB- than in saline-treated rats, particularly in immature animals and in the cerebral cortex (Table 3).

This more active conversion of [3- ^{14}C] ßHB into cerebral amino acids in PhB- than in saline-treated animals is certainly the result of the significantly higher concentration of circulating ßHB in these animals, since ketone bodies are known to be taken up and utilized by the immature brain at a rate linearly related to their arterial concentration (10,13).

Conclusions

The results of the present study show that early chronic PhB treatment does not have a significant incidence on the concentration of amino acids in the three brain areas studied. However, the chronic exposure to PhB induces a shift in the balance of cerebral energy metabolism, translating into a decrease in the rate of glucose utilization and an increase in the rate of ßHB utilization as precursors for cerebral amino acid biosynthesis. These effects appear to be similar to those induced by undernutrition on cerebral energy metabolism (16,18,19). Since sedation-induced undernutrition could accompany barbiturate administration in rat pups, it can be questioned whether these effects of PhB on brain energy metabolism are direct or partly mediated by undernutrition. In previous studies on artificially reared pups, it has been shown that PhB directly alters brain growth of the infant rat and that this effect is greater than would be expected by reduced caloric intake alone (5,22). Also, the degree of undernutrition inducing the same changes in cerebral energy metabolism as those observed after PhB treatment needs to be quite severe and leads to a 40 % decrease in body weight (16). Moreover, the neuromorphological deficits resulting from chronic PhB treatment are quite different from those following undernutrition. Indeed, PhB is able to destroy already formed neurons, whereas undernutrition affects only proliferating cells. However, the dendritic processes of the remaining Purkinje cells are more severely affected by undernutrition than by PhB (20,26,28). It then appears that the effects of early chronic PhB treatment on brain energy metabolism are likely to be mainly direct effects.

In conclusion, it finally seems, as shown by the retardation of body and brain growth (18), that the brain would stay in a more immature state in PhB-treated animals. These results raise the question of a possible incidence of this growth retardation and shift in the cerebral energy balance on subsequent brain development, behavior and learning capacities after early chronic PhB exposure.

REFERENCES

1. Agrawal HC, Davis JM, Himwich WA. Postnatal changes in free amino acid pool of rat brain. J Neurochem 1966 ; 13 : 607-615.

2. Booker HE. Phenobarbital relation of plasma concentration to seizure control. In : Woodbury DM, Penry JK, Pippenger CE, eds. Antiepileptic drugs. New York : Raven Press, 1982 ; 341-350.

3. DeVivo DC, Leckie MP, Agrawal HC. The differential incorporation of ß-hydroxybutyrate and glucose into brain glutamate in the newborn rat. Brain Res 1973 ; 55 : 485-490.

4. DeVivo DC, Leckie MP, Agrawal HC. D-ß-hydroxybutyrate : a major precursor of amino acids in developing rat brain. J Neurochem 1975; 25 : 161-170.

5. Diaz J, Schain RJ, Bailey BG. Phenobarbital-induced brain growth retardation in artificially reared rat pups. Biol Neonate 1977 ; 32 : 77-82.

6. Dravid AR, Jilek L. Effect of stagnant hypoxia (oligaemia) on some free amino acids in rat brain during ontogeny. J Neurochem 1965; 12 : 837-843.

7. Flexner LB. The development of the cerebral cortex : a cytological functional and biochemical approach. Harvey Lectures 1951-1952; Series XLVII : 156-179.

8. Gaitonde MK, Richter D. Changes with age in the utilization of glucose carbon in liver and brain. J Neurochem 1966 ; 13 : 1309-1318.

9. Gal P, Toback J, Boer HR et al. Efficacy of phenobarbital monotherapy in the treatment of neonatal seizures. Relationship to blood levels. Neurology 1982 ; 32 : 1401-1404.

10. Girard J, Ferré P. Metabolic and hormonal changes around birth. In : Jones CT, ed. Biochemical development of the fetus and neonate. Amsterdam : Elsevier, 1982 ; 517-551.

11. Hawkins RA, Williamson DH, Krebs HA. Ketone-body utilization by adult and suckling rat brain in vivo. Biochem J 1971 ; 122 : 13-18.

12. Jolley ME, Stroupe SD, Schwenzer KS, et al. Fluorescence polarization immunoassay. III An automated system. Clin Chem 1981 ; 27 : 1575-1579.

13. Kraus H, Schlenker S, Schwedesky D. Developmental changes of cerebral ketone body utilization in human infants. Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 1974 ; 355 : 164-170.

14. Lu-Steffes M, Pittluck JW, Jolley ME, et al. Fluorescence polarization immunoassay. IV Détermination of phenytoin and phenobarbital in human serum and plasma. Clin Chem 1982 ; 28 : 2278-2282.

15. Mellanby J, Williamson DH. Acetoacetate. In : Bergmeyer HU, Gawehn K, eds. Methods of enzymatic analysis, Vol 4, New York : Academic Press, 1974 ; 1840-1843.

16. Patel AJ, Balazs R. Factors affecting the development of metabolic compartmentation in the brain. In : Berl S, Clarke DD, Schneider D, eds. Metabolic compartmentation and neurotransmission. Relation to brain structure and function. New York : Plenum Press, 1975 ; 363-383.

17. Patel MS, Owen OE. Development and regulation of lipid synthesis from ketone bodies by rat brain. J Neurochem 1977 ; 28 : 109-114.

18. Pereira de Vasconcelos A, Nehlig A. Effects of early chronic phenobarbital treatment on the maturation of energy metabolism in the developing rat brain. I. Incorporation of glucose carbon into amino acids. Dev Brain Res 1987 ; 36 : 219-229.

19. Pereira de Vasconcelos A, Schroeder H, Nehlig A. Effects of early chronic phenobarbital treatment on the maturation of energy metabolism in the developing rat brain. II Incorporation of ß-hydroxybutyrate into amino acids. Dev Brain Res 1987 ; 36 : 231-236.

20. Pysh JJ, Perkins RE, Singer-Beck L. The effect of postnatal undernutrition on the development of the mouse Purkinje cell dendritic tree. Brain Res 1979 ; 163 : 165-170.

21. Schain RJ, Watanabe K. Effect of chronic phenobarbital administration upon brain growth of the infant rat. Exp Neurol 1975 ; 47 : 509-515

22. Schain RJ, Watanabe K. Origin of brain growth retardation in young rats treated with phenobarbital. Exp Neurol 1976 ; 50 : 806-809.

23. Vernadakis A, Woodbury DM. Electrolyte and amino acid changes in rat brain during maturation. Am J Physiol 1962 ; 203 : 748-752.

24. Williamson DK, Mellanby J. D-(-)-3-Hydroxybutyrate. In : Bergmeyer HU, Gawehn K, eds. Methods of enzymatic analysis, Vol 4. New York : Academic Press, 1974 ; 1836-1839.

25. Yanai J. An animal model for the effect of barbiturate on the development of the central nervous system. In Yanai J, ed. Neurobehavioral Teratology. Amsterdam : Elsevier, 1984 ; 111-132.

26. Yanai J, Bergman A. Neuronal deficits after neonatal exposure to phenobarbital. Exp Neurol 1981 ; 73 : 199-208.

27. Yanai J, Bergman A, Shafer R, et al. Audiogenic seizures and neuronal deficits following early exposure to phenobarbital. Dev Neurosci 1981 ; 4 : 345-350.

28. Yanai J, Iser C. Stereologic study on Purkinje cells in mice following early exposure to barbiturate. Dev Neurosci 1981 ; 74 : 707-716.

29. Yeh YY, Streuli VL, Zee P. Ketone bodies serve as important precursors of brain lipids in the developing rat. Lipids 1977 ; 12 : 957-964.

TABLE 1

Plasma levels of phenobarbital

Age of the animals (days)	Phenobarbital (μg/ml)
7	64 ± 5 (6)
10	70 ± 7 (6)
14	80 ± 9 (10)
21	53 ± 6 (8)
35	41 ± 5 (11)

Values are means ± S.D. of the number of animals in parentheses.

TABLE 2

Specific radioactivities of amino acids in the three brain areas of saline and PhB-treated 10 and 35 day-old rats after the administration of (2-^{14}C) glucose.

	10 days		35 days	
	Saline	PhB	Saline	PhB
Cerebral cortex				
Glutamate	4114 ± 596	3431 ± 371	8293 ± 124	6360 ± 364 **
Glutamine	1322 ± 130	1352 ± 405	4626 ± 414	3575 ± 50 **
Aspartate	2521 ± 132	1662 ± 227**	6223 ± 102	4648 ± 310**
GABA	2680 ± 203	1412 ± 324**	4785 ± 636	2510 ± 1153*
Subcortical areas				
Glutamate	4148 ± 1121	3928 ± 1304	8925 ± 2979	11508 ± 1550
Glutamine	1782 ± 628	2615 ± 784	4996 ± 941	4185 ± 1879
Aspartate	2888 ± 976	3742 ± 715	6033 ± 1183	6465 ± 260
GABA	1211 ± 252	2605 ± 426**	4642 ± 494	3818 ± 627
Cerebellum				
Glutamate	4244 ± 98	3656 ± 533	7582 ± 134	6708 ± 317*
Glutamine	2393 ± 46	901 ± 162**	4642 ± 346	2598 ± 179**
Aspartate	2867 ± 100	1766 ± 532*	4881 ± 92	3163 ± 185**
GABA	3335 ± 74	1837 ± 260**	4705 ± 95	1934 ± 84**

Values, expressed as dpm/µmol amino acid, are means ± S.D. of 3-4 experiments.
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, statistically significant differences between saline-and PhB-treated animals (Student's test)

TABLE 3

Specific radioactivities of amino acids in the three brain areas of saline-and PhB-treated 10 and 35 day-old rats after the administration of (3-^{14}C) ß-hydroxybutyrate.

	10 days		35 days	
	Saline	PhB	Saline	PhB
Cerebral cortex				
Glutamate	5075 ± 507	8330 ± 1800*	587 ± 133	872 ± 180
Glutamine	1476 ± 334	2580 ± 155**	571 ± 26	961 ± 105**
Aspartate	3095 ± 543	4141 ± 365*	306 ± 116	301 ± 83
GABA	1050 ± 178	2594 ± 542**	304 ± 108	608 ± 140*
Subcortical areas				
Glutamate	5703 ± 1467	9508 ± 1614*	634 ± 151	1103 ± 44**
Glutamine	2532 ± 1039	3106 ± 437	602 ± 258	820 ± 52
Aspartate	4510 ± 704	6482 ± 1694	453 ± 65	845 ± 411
GABA	1829 ± 352	2468 ± 648	N.D.	785 ± 50
Cerebellum				
Glutamate	5487 ± 922	6902 ± 1076	882 ± 138	987 ± 144
Glutamine	2619 ± 547	3492 ± 345	836 ± 47	1035 ± 146
Aspartate	2314 ± 575	4830 ± 494**	1262 ± 112	1314 ± 145
GABA	2258 ± 452	5010 ± 391**	N.D.	N.D.

Values, expressed as dpm/µmol amino acid, are means ± S.D. of 3-4 experiments.
N.D. : radioactivity of the amino acid not detectable.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, statistically significant differences between saline -and PhB-treated animals (Student's test).

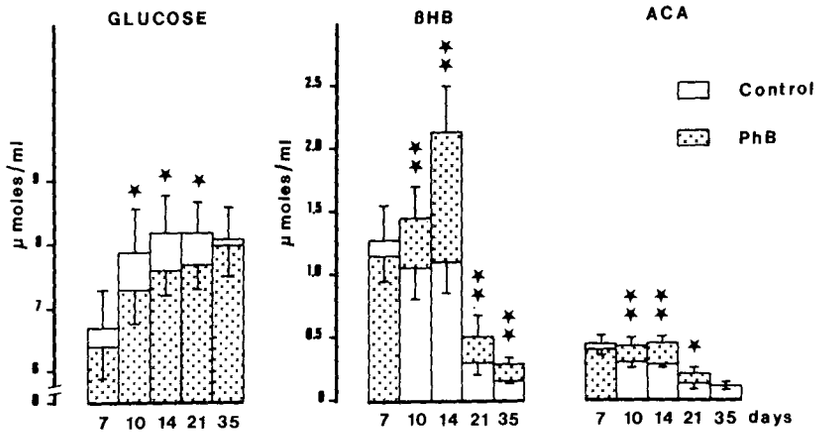


Figure 1

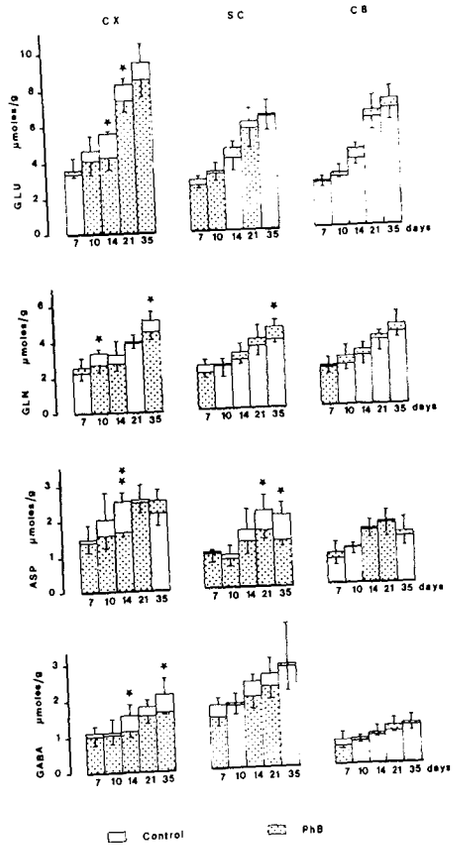


Figure 2

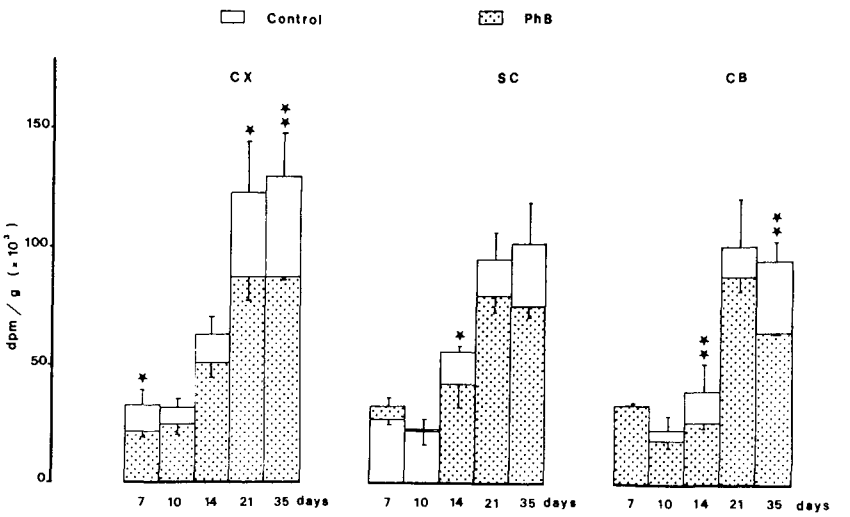


Figure 3

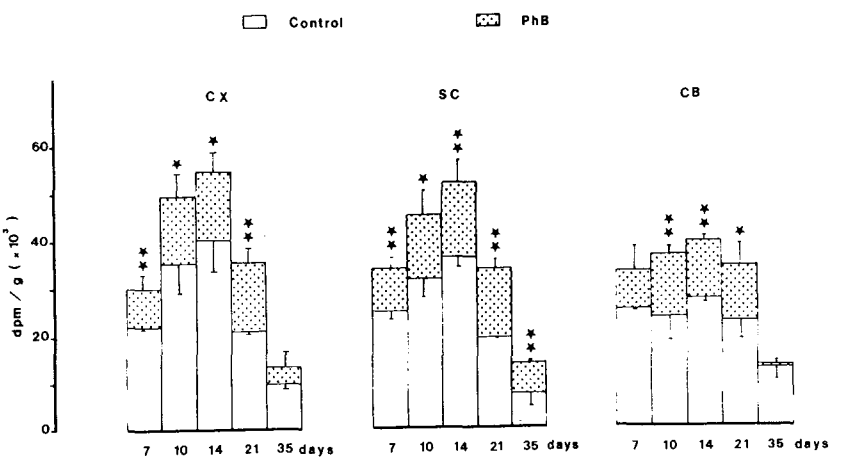


Figure 4

Legend to Figures

Figure 1 :

Influence of PhB on postnatal evolution of plasma glucose, ßhB and AcA concentrations.

Values are means ± S.D. of 4-12 experiments.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Statistically significant differences between control ad PhB- treated aimals (Student's test).

Figure 2 :

Influence of PhB on postnatal evolution of amino acid concentration in the three brain fractions.

Values are means ± S.D. of 3-4 experiments.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Statistically significant differences between control and PhB- treated animals (Student's test).

Abbreviations : CX : cerebral cortex ; SC : subcortical areas ; CB : cerebellum ; GLU : glutamate ; GLN : glutamine ; ASP : aspartate.

Figure 3 :

Influence of PhB on postnatal evolution of the radioactivity of the amino acid fraction after the administration of [2-^{14}C] glucose.

Values are means ± S.D. of 3-4 experiments.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, Statistically significant differences between control and PhB- treated aimals (Student's test).

Abbreviations : CX : cerebral cortex ; SC : subcortical areas ; CB : cerebellum.

Figure 4 :

Influence of PhB on postnatal evolution of the radioactivity of the amino acid fraction after the administration of [3-^{14}C] ßHB.

Values are means ± S.D. of 3-4 experiments.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, Statistically significant differences between control and PhB- treated animals (Student's test).

Abbreviations : CX : cerebral cortex ; SC : subcortical areas ; CB : cerebellum.

MEMOIRE D

Develop. Brain Res., sous presse

CONSEQUENCES OF CHRONIC PHENOBARBITAL TREATMENT ON LOCAL CEREBRAL GLUCOSE UTILIZATION IN THE DEVELOPING RAT

Anne PEREIRA DE VASCONCELOS*, Sylvette BOYET and Astrid NEHLIG

INSERM U272

Université de Nancy I

30, rue Lionnois

BP 3137

54013 NANCY - FRANCE

Phone number : 83.37.35.59

* to whom all correspondence should be addressed

SUMMARY

The influence of a chronic phenobarbital (PhB) treatment on postnatal evolution of local cerebral metabolic rates for glucose (LCMRglc) was studied in 58 cerebral structures of freely-moving rats. The animals received a daily subcutaneous injection of PhB at a dose of 50 mg/kg between day 2 and 35 or an equivalent volume of saline for controls and were studied at 5 postnatal stages, i.e. 10, 14, 17, 21 and 35 days, and at the adult stage. Body and brain weights were both reduced by 6 to 21 % over the whole period studied. PhB exposure induced significant decreases in LCMRglc during the period of pharmacological treatment, i.e. until 35 days, except at the stage of 17 days as well as long-term reductions in LCMRglc of adult rats in 36 out of the 58 brain regions studied. These decreases affected all systems studied, sensory systems as well as limbic, hypothalamic, motor and white matter areas. PhB also seemed to be able to induce in addition to a growth retardation, a delay in the acquisition of auditory function which matures early during postnatal life. The long-term deficits in cerebral energy metabolism due to PhB in the adult rat also confirm the behavioral deficits which have been shown previously after early PhB exposure.

KEY WORDS : 2-[^{14}C]Deoxyglucose ; Development ; Rat brain ; Phenobarbital ; Barbiturate ; Chronic treatment.

INTRODUCTION

Phenobarbital (PhB) is an anticonvulsant drug commonly administered both to epileptic mothers, even during their pregnancy, and to neonates for prevention and therapy of convulsive disorders. Chronic administration of PhB to pregnant rodents or to their offspring has been shown to induce a decrease in body and brain weights[9,40,44,52,55]. This reduction in brain weight is associated with long-lasting deficits in cell numbers, mainly at the level of cerebellar Purkinje cells and hippocampal pyramidal cells. The cellular damage appears whether barbiturate treatment has been pre- or postnatal, showing that PhB is able to disturb neuronal differentiation as well as to destroy already formed neurons[17,18,51-55].

In previous experiments from our laboratory, we showed that a chronic PhB treatment is also able to induce a shift in the cerebral energy metabolism balance. Indeed, in rat pups exposed to PhB from day 2 to 35, the biosynthesis of cerebral amino acids from glucose is reduced whereas that from ß-hydroxybutyrate is increased over the whole period of pharmacological treatment. However, this shift in the cerebral energy metabolism balance does not induce any changes in brain amino acid levels[40,41].

In addition, it has been shown that a chronic administration of PhB is able to induce behavioral alterations in the adult rat. Indeed, deficits in the learning capacities in different kinds of mazes have been reported[2,29,42,43], as well as disturbances in the locomotor activity of rodents[9,28]. The intensity of these deficits varies as a function of the dose, the period and the duration of the treatment.

Since some brain areas were shown to be specifically affected by PhB[17,18,51-55] and since the rates of amino acid biosynthesis from glucose appeared to be a metabolic pathway sensitive to this barbiturate, we applied the quantitative autoradiographic 2-[^{14}C]deoxyglucose method of Sokoloff et al.[49] recently adapted to the developing rat[31] to the measurement of local cerebral metabolic rates for glucose (LCMRglc) in PhB-treated rats. The study was performed in rats exposed to an anticonvulsant dose of PhB (50 mg/kg/day) from postnatal day 2 to 35. Short-term effects of the pharmacological

treatment on LCMRglc were studied from day 10 to 35 and long-term effects of PhB on LCMRglc were measured in adult rats previously exposed to the barbiturate. PhB therapy was applied from postnatal day 2 to 35, in order to encompass the whole period of postnatal maturation. Indeed, by about 30 days, the complexity and density of dendritic arborization is approaching that of the adult rat[13].

MATERIALS AND METHODS

Animals

Adult Sprague-Dawley rats, one male and two females by cage, were housed together in mating groups for 5 days and constantly maintained under standard laboratory conditions on a 12:12 h light/dark cycle (lights on at 6:00 h). Food and water were available ad libitum. After delivery, litter sizes were reduced to 10 pups for homogeneity. Sodium phenobarbital (5-ethyl-5-phenylbarbituric acid, sodium salt, Fluka, Buchs, Switzerland), dissolved in saline was administered subcutaneously to the pups from day 2 to 35 after birth, daily at a dose of 50 mg/kg. Control animals received the same volume of saline. The pharmacological treatment was the same inside each litter, either saline or PhB for all animals to get pups all about the same size in the litter and to prevent the mother from rejecting the low weighted PhB-treated rats. However, to avoid a litter effect, the experiments were performed on three different litters for each treatment and each stage studied. Rat pups were weaned at postnatal day 21 (P 21). The experiments were performed on a total number of 60 rats, 30 saline- and 30 PhB-treated animals at 10, 14, 17, 21 and 35 days after birth and at the adult stage (70-80 days) at about 3 h after the injection of the drug. Before weaning, both male and female rat pups were used, but only male animals were used after weaning.

A femoral artery and vein were catheterized with polyethylene catheters under light halothane anesthesia. Both catheters were threaded under the skin, up to the neck through a small opening in the skin. A loop was made with the end of each catheter, which were put back under

the skin, and the small opening in the skin was closed. The animals were returned to their normal environment, back to their mother for suckling rats and allowed food and water ad libitum. The experiments were performed on the following day. Only those animals that did not suffer from the surgery and did not loose weight (especially for suckling rats which were sometimes rejected by the mother) were used for the study.

Measurement of local cerebral glucose utilization

On the day of the experiment, the rats were transferred to an uncovered plastic box of variable size according to the stage studied, allowing free access to the catheters as well as free movement of the animals. The threads on the skin in the neck were cut and the catheters were pulled out.

LCMRglc were measured by the 2-[^{14}C]deoxyglucose (2DG) method described by Sokoloff et al.[49] and adapted to the developing rat[31]. The 2-[^{14}C]deoxyglucose (125 µCi/kg ; spec. act., 45-60 mCi/mmol ; Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, France) was injected as an i.v. pulse. Nine to 20 timed arterial blood samples were drawn during the following 45 min in glass capillary tubes for developing animals and in plastic tubes for adult rats. The volumes of the samples ranged from 10 to 75 µl according to the animal's age. The blood samples were immediately centrifuged in a Hettich Microrapid microfuge and the plasma concentration of 2DG was determined by liquid scintillation counting on 3-20 µl samples (Beckman scintillation counter model LS 1801 ; Beckman Instruments, Fullerton, CA). Plasma glucose concentrations were assessed from 10 µl samples by means of a Beckman glucose analyzer, on 3 larger samples from immature animals and all samples from adult rats.

At approximately 45 min after the pulse of 2-[^{14}C]deoxyglucose, the animals were killed by decapitation. Brains were rapidly removed and frozen in isopentane chilled to -35°C, coated with chilled embedding medium (carboxymethylcellulose 4 % in water), and stored at - 80°C in plastic bags until sectioned and autoradiographed. The brains were then cut into 20 µm coronal sections at - 22°C in a cryostat. Sections were picked up on glass coverslips and dried on a hot plate (60°C). Sections were autoradiographed on Kodak SB5 film along with calibrated

[^{14}C]methylmethacrylate standards (Amersham, Arlington Heights, IL), using a special set of low ^{14}C concentration standards for animals 10-, 14- and 17-day old. All standards were calibrated for their ^{14}C concentration in brain sections as previously described[49]. Adjacent sections were fixed and stained with thionin for histological identification of specific nuclei.

The autoradiographs were analyzed by quantitative densitometry with a computerized image processing system (Biocom 200, France) or a manual microdensitometer (Macbeth, TD901, Kollmorgen Co., Newburgh, NY). Optical density measurements for each structure anatomically defined according to the rat brain atlas of Paxinos and Watson[39] for adult animals and to the developing rat brain atlas of Sherwood and Timiras[46] for all other stages were made bilaterally in a minimum of 4 brain sections. All densitometry was conducted without knowledge of the treatment of the animal. Tissue ^{14}C concentrations were determined from the optical densities of the autoradiographic representations of the tissues and a calibration curve obtained from the autoradiographs of the calibrated standards. For the final calculations, the exact time of blood sampling was corrected for the time lag due to the residual volume of blood in the catheter. The lag was calculated from the value of the volume of the arterial catheter and the blood flow rate of each animal. The lag ranged from 2 to 6 s and was substracted from the recorded time of sampling. LCMRglc were then calculated from the local tissue concentration of ^{14}C, the time courses of the plasma 2DG and glucose concentrations, and the appropriate constants according to the operational equation of the method[49].

Plasma phenobarbital measurement

Plasma PhB levels were measured by radiative energy attenuation applied to fluorescence polarization immunoassay by means of a TDX analyzer (Abbott Instruments, Wiesbaden, F.R.G.), according to the method described by Jolley et al.[20] and Lu-Steffes et al.[24].

Physiological functions

Just prior to the administration of the 2DG pulse, mean arterial blood pressure was measured with an air-damped mercury manometer. Suckling rat pups were maintained under a heating lamp to keep their body temperature in the physiological range. Hematocrit was determined from blood samples collected into capillary tubes at about 30 min after isotope injection. Just before sacrifice of the animals, a sample of 40 to 80 µl of arterial blood was taken for analysis of blood pH, pO_2 and pCO_2, which were measured with a blood gas analyzer (Corning, model 158, Corning Medical and Scientific, Halstead, England).

Statistical analysis

LCMRglc were determined in 58 structures in 12 groups of 5 animals each, 6 groups of controls, and 6 groups of PhB-treated rats. The values of LCMRglc obtained for each structure underwent three statistical analyses. First, a two-way analysis of variance was performed, following the procedure described by Kirk[23] to test the effects of the age, of the nature of the treatment and the effects of the age versus the nature of the pharmacological treatment. In the second analysis, LCMRglc in each group of either saline- or PhB-treated animals were compared to the values in the immediate preceding stage by means of Bonferroni multiple comparison procedures[23]. These conservative multiple comparison procedures were chosen to reduce the likelihood of type II errors in view of the large number of statistical procedures performed. In the third analysis, at each stage, values of LCMRglc in the PhB-treated group were compared with those in the control group by means of a Student's t-test.

RESULTS

General effects of phenobarbital treatment

Between 7 and 14 days, when the circulating barbiturate level 3 h after its administration was quite high, PhB induced a transient sedation without any anesthetic effect for a few hours. At 17, 21 and 35 days, when blood PhB concentration decreased and when a relative tolerance to the drug had appeared, the barbiturate did not induce any significant effect on behavior or muscular tone. Likewise, during the first 3 or 4 h following PhB injection, there was no variation of body temperature at any stage studied. Similar observations were reported previously after daily administration of 60 mg/kg PhB over the same period of development[44].

Physiological variables

As shown in Table I, body weight of the animals significantly increased in both groups between P21 and P35 and again between P35 and the adult stage. Body and brain weights were significantly reduced by 6 to 21 % in PhB- as compared to saline-treated rats at all studied stages. Plasma glucose concentration significantly increased between P21 and P35 in control animals and more regularly over the period studied in PhB-treated rats. Plasma PhB concentration significantly increased between P10 and P14, stage at which it reached its highest level. Thereafter, plasma PhB concentration significantly declined at all stages studied until P35. Arterial blood pressure significantly increased after P14 and reached similar values in both groups at all studied stages. Hematocrit value regularly increased after P14 in control animals and after P21 in PhB-treated rats. Hematocrit values were significantly lower in PhB- than in saline-treated rats at P14, P21, P35 and at the adult stage.

Arterial pH and pO_2 values were not influenced either by age or by the nature of the treatment, except at P17 where pO_2 was lower in PhB- than in saline-treated rats. PCO_2 values significantly increased between

P10 and P14 in control and between P21 and P35 in PhB-exposed rats. In addition, PCO_2 values were significantly higher in PhB- than in saline-treated rats at P10.

Local cerebral glucose utilization

The chronic PhB administration induced a statistically significant and general decrease in LCMRglc in most structures studied at all developmental stages except at P17. The widespread effects of PhB translated into a 12 to 43 % decrease in the value of the average rate of glucose utilization for the brain as a whole weighted for the masses of its component parts in PhB- as compared to saline-treated rats, except at P17 (Table VI, Fig. 1). Decreases in LCMRglc in PhB-treated rats as compared to controls were most marked at P10, P14 and P21, as shown in Fig. 1, both for whole brain weighted average and representative structures in the regions most sensitive to PhB, i.e. cortex, hippocampus and cerebellum. In adult animals, about 45 days after the end of the pharmacological treatment, LCMRglc were still significantly reduced in PhB- as compared to saline-treated rats in about 62 % of the structures studied, as shown in Fig. 1. In addition, the postnatal overall evolution of cerebral glucose utilization levels was different in saline- and PhB-treated rats. Indeed, weighted average glucose utilization levels significantly increased between P17 and P21 and between P35 and the adult stage in control rats, whereas they increased between P14 and P17 and regularly after P21 in PhB-treated rats.

Two-way analysis of variance

The data of the two-way analysis of variance which are not given in the Tables indicate that there was an effect of the age on the rate of LCMRglc. For the age effect, P value was $< 10^{-4}$ in the 58 structures studied without any exception. The effects of the nature of the treatment were also significant in almost all areas except in the lateral septum and in the interpeduncular nucleus. In most structures in which the treatment significantly affected LCMRglc, P value was $< 10^{-4}$

except in 8 areas where it ranged from 0.05 to 3.10^{-4}. The effects of the age versus the nature of the pharmacological treatment were significant in 35 out of the 58 structures studied. These were 4 auditory areas, the auditory cortex, medial geniculate body, inferior colliculus and lateral lemniscus, 2 visual regions, the visual cortex and the superior colliculus, as well as the vestibular nucleus (Table II). Within limbic structures, there was an interaction between age and treatment in the frontoparietal cortex, somatosensory area, the two septal regions, dentate gyrus and mediodorsal thalamus, lateral habenula and all midbrain and hindbrain limbic regions (Table III). In the hypothalamus, the interaction between age and treatment was significant in all structures except in the paraventricular nucleus (Table IV), and in the motor areas it reached significance in both parts of the substantia nigra, the subthalamic nucleus and the ventroanterior thalamus within striatial circuits and in all areas except in the cerebellar cortex among cerebellar circuits (Table V).

Postnatal evolution of local cerebral glucose utilization in saline- and PhB-treated rats (Bonferroni's t-test).

In saline-treated rats, LCMRglc significantly increased between P10 and P14 in 5 brain areas, i.e. 4 auditory regions, the medial geniculate body, inferior colliculus, lateral lemniscus and superior olive (Table II), as well as in the medial septum (Table III). Between P14 and P17, LCMRglc statistically significantly increased in only 2 areas, the auditory cortex and the visual mesencephalic relay, the lateral geniculate body (Table II). In control rats, LCMRglc significantly increased by P21 in 54 out of the 58 structures studied. There were no significant changes in LCMRglc in the superior olive (Table II), medial amygdala (Table III) and in one white matter area, the genu of the corpus callosum (Table IV). Between P21 and P35, LCMRglc still increased in 27 regions which were mainly sensory (Table II) and motor areas (Table V) ; LCMRglc increased only in 7 limbic regions out of the 24 studied (Table III) and did not change in hypothalamic (Table IV) and white matter areas (Table VI). Between P35 and the adult stage, LCMRglc statistically significantly increased in 34 regions of control rats.

These changes where located in most systems studied, sensory (Table II), limbic (Table III) and motor areas (Table V). Within hypothalamic structures, LCMRglc only increased in mammillary body (Table IV), and there was no change after P35 in LCMRglc in white matter areas of control rats (Table VI).

In PhB-exposed rats, LCMRglc significantly increased between P10 and P14 in 14 structures. These were mainly 3 limbic areas, the lateral habenula, interpeduncular nucleus and ventral tegmental area (Table III), the anterior hypothalamus and mammillary body (Table IV) and 9 motor areas, all cerebellar circuit structures except the cerebellar cortex and 4 striatal structures (Table V). Between P14 and P17, LCMRglc significantly increased in 44 areas within the 58 studied. Increases were located mainly in all sensory (Table II) and hypothalamic regions (Table IV) and affected 17 out of 24 limbic areas (Table III) as well as 9 out of 14 motor stuctures (Table V). Between P17 and P21, LCMRglc increased in only 3 brain areas i.e. the prefrontal and anterior cingulate cortices (Table III) and the subthalamic nucleus (Table V). Between P21 and P35, LCMRglc increased in 38 structures of PhB-treated rats. These were all sensory regions, except the lateral lemniscus and superior olive (Table II), 17 out of 24 limbic areas (Table III) and 11 out of 14 motor structures (Table V). In hypothalamus, LCMRglc only changed in mammillary body (Table IV). Between P35 and the adult stage, LCMRglc still increased in 44 brain regions of PhB-treated rats. These were mainly all sensory structures (Table II), all hypothalamic areas

except the paraventricular nucleus (Table IV), 16 limbic regions (Table III) and all motor regions, except the dorsomedian caudate nucleus and the globus pallidus (Table V).

Influence of the phenobarbital treatment on local cerebral glucose utilization at different ages (Student's t-test).

LCMRglc were significantly reduced by PhB as compared to control values in all areas studied at P10 (Tables II-VI). These reductions ranged between 35 to 45 % in all structures. At P14, LCMRglc were reduced in 52 brain structures out of 58 studied in PhB- as compared to saline-treated rats. LCMRglc were not affected by PhB treatment at P14 in 2 hypothalamic (Table IV), 2 motor (Table V) and 1 white matter area (Table VI). At P17, LCMRglc in PhB-exposed rats were significantly different from control values in 10 areas. At that developmental stage, LCMRglc in PhB-treated animals were either equal to or higher than in controls. These significant increases over control values were located in 6 limbic areas, i.e. medial and lateral septum, basolateral amygdala, interpeduncular nucleus, medial raphe and locus coeruleus (Table III), 3 hypothalamic structures, anterior, ventromedian and dorsomedian nuclei (Table IV) and one motor area, the interpositus nucleus (Table V). At P21, LCMRglc in PhB-exposed rats were significantly lower than in controls in almost all brain areas studied, i.e. 50 out of the 58 studied. These reductions in LCMRglc were equally distributed among all systems studied. At P35, LCMRglc were still reduced after the barbiturate treatment in 35 brain areas as compared to control animals. These reductions affected again all systems studied. Finally, at the adult stage, i.e. 35 to 45 days after the end of the parmacological treatment, LCMRglc remained decreased in PhB- as compared to saline-treated rats in 36 brain regions among the 58 studied. These changes were equally distributed among all systems studied.

DISCUSSION

The results of the present study demonstrate that a chronic PhB treatment from postnatal day 2 to 35 is able to induce a short-term depression of cerebral glucose utilization during the period of the treatment, i.e. between P10 and P35. These results confirm our previous data showing that the incorporation of glucose carbon into cerebral amino acids was reduced in PhB-treated rats as compared to controls between P10 and P35[40]. In addition, this early barbiturate treatment is able to induce long-term depressions in LCMRglc in the adult rat. These short- and long-term decreases in LCMRglc are accompanied by reductions in body and brain weights, the most part of which cannot be accounted for by nutritionnal effects. Indeed, the retarding effect of PhB on brain growth is greater than would be expected by reduced caloric intake alone[45]. In addition, Diaz et al.[10] also showed that artificially reared rat pups, fed by an intragastric cannula to prevent drug-induced undernutrition, experienced a marked reduction of early brain growth, although their body growth remained normal. In addition, to reach brain growth deficits as high as those recorded in the present study, the undernutrition needs to be quite severe and to induce about 60 % reduction in body weight[37].

The depression in the LCMRglc appears to be particularly marked at the beginning of postnatal development, especially at P10, but also at P14. This important decrease in LCMRglc related to the PhB exposure between P10 and P14 appears at a critical period of maturation of glucose cerebral metabolism. Indeed, the rapid incorporation of glucose carbon into amino acids, which is a characteristic of cerebral energy metabolism of the mature brain in vivo, essentially develops between P10 and P15 in the rat and reaches by P22 rates similar to those in the adult brain[4,7,8,15]. These changes are paralleled by simultaneous increases in cerebral oxygen consumption[14] and in the activity of cerebral energy metabolism enzymes[48]. The reduction in LCMRglc induced by PhB at these early stages raises the question of the acquisition of functions such as audition which takes places around P12[6,30-32]. Indeed, as previously shown in several studies performed with autoradiographic techniques[1,3,21,22,31,32] a rise in metabolic rate of a particular

structure generally marks the time at which it begins to contribute to an animal's function or behavior. In the present study, as far as auditory function is concerned, LCMRglc remains significantly depressed at P10 and P14 in PhB-treated rats as compared to controls. In addition, LCMRglc significantly increase between P10 and P14 in 4 areas in control rats. These are two posterior structures, the lateral lemniscus and superior olive, the mensencephalic auditory relay, i.e. the inferior colliculus and the thalamic relay, i.e. the medial geniculate body (Table II). On the other hand, in PhB-treated rats, LCMRglc significantly increase between P10 and P14 only in two posterior areas, the lateral lemniscus and superior olive. In then appears that the general reduction in LCMRglc in PhB-treated rats as compared to controls, as well as the depression in the incorporation of glucose carbon into animo acids[40] may translate into a retardation in the maturation of auditory function induced by the barbiturate treatment.

Conversely, the visual function matures around P15 when the eyes open[30]. LCMRglc significantly increases between P14 and P17 in the lateral geniculate body in both groups of animals (Table II). In addition, LCMRglc significantly increase in two other areas of the visual system, the visual cortex and the superior colliculus between P14 and P17 but only in PhB-treated animals. However, this increase in LCMRglc in PhB-exposed rats is not specific to visual structures but appears in almost all cerebral areas studied (Table II-VI). This general increase in LCMRglc throughout the brain at P17 appears to be the reflection both of the marked depression in glucose utilization rates at P10 and P14 in PhB- as compared to saline-treated rats and of the absence of difference in LCMRglc between the two groups of animals at P17. In this respect, the stage of P17 appears to be quite different from all the other ones studied. Indeed, PhB is able to induce a reduction in LCMRglc at all developmental stages, except at P17. In addition, in previous studies on the postnatal evolution of the coupling between cerebral blood flow and glucose utilization, we were able to show an uncoupling between these two parameters of cerebral functional activity precisely at the stage P17, whereas they stay coupled at all other stages of postnatal development[33,34]. The stage of P17 may then represent a quite specific and vulnerable period of cerebral development

in the rat. Indeed, at P17, the pathways of incorporation of glucose carbon into amino acids begin to reach higher rates[4,15] whereas brain ketone body utilization remains still very active[7,8,19], reflecting a very active phase of brain maturation, mainly characterized by an intense myelination[38,50]. At P17, pO_2 is reduced by 10 % in PhB- as compared to saline-treated rats. Cerebral glucose utilization has been shown to increase during moderate hypoxia[5,16,25,47]. However, this very moderate decrease in pO_2 which remains in the physiological range is unlikely to account for the relatively higher levels of glucose utilization at that stage in PhB-exposed rats as compared to the other stages.

Nevertheless, the chronic barbiturate exposure completely modifies the pattern of cerebral maturation as compared to control subjects. So, in saline-treated rats, LCMRglc significantly increase in most structures between P17 and P21, as shown in our previous studies[31,32]. In PhB-treated rats, LCMRglc rather increase between P14 and P17 to reach at that latter stage levels close to those of control and again increase between P21 and P35 (Tables II-VI).

In the adult rat, LCMRglc remain significantly reduced at about 45 days after the end of barbiturate treatment as compared to control values in 36 out of the 58 cerebral regions studied. This long-term decrease in LCMRglc is accompanied by long-term reductions of body and brain weights (Table I) which, as discussed previously, are rather mostly direct than undernutrition-mediated effects. In addition, prenatal or neonatal barbiturate treatment in rat or mouse has been shown to result in irreversible deficits in locomotor activity and learning capacities of adult animals in different types of mazes. These effects are independant from nutritional intake and are mainly related to the drug itself[9]. The importance of the behavioral disturbances also varies as a function of the dose, period and duration of barbiturate treatment[2,9,26,27,29,42, 43]. In the mouse, behavioral deficits in a T and in an eigt arm maze are more severe after a neonatal than after a prenatal exposure to PhB[42,43]. These deficits seem to be related to the more extensive damage in the hippocampus after a neonatal exposure to PhB[42,43,52]. Indeed, space orientation and alternation behaviors measured in T or eight arm mazes are well known to be correlated with

the hippocampus[11,12,35,36]. However, in the rat no extensive studies on cellular deficits after an early PhB exposure have been achieved, at least not at the level of the hippocampus. Only Hannah et al.[17,18] were able to show a decreased number of cerebellar Purkinje cells after an early PhB treatment in the rat. Neuronal deficits at the level of the cerebellum also occur in mice treated with PhB, either pre- or postnatally[51-55]. The results of the present study show long-lasting LCMRglc reductions in hippocampal areas in the adult rats which may at least partly account for the behavorial deficits, especially learning capacities in various types of mazes, which have been recorded in rats after early PhB exposure[2,9,29].

In conclusion, it appears from the present study that a chronic PhB treatment from postnatal day 2 to 35 is able to induce depressions in LCMRglc during the period of its administration as well as long-lasting reductions in LCMRglc after the cessation of the treatment in the adult rat. These decreases in LCMRglc may be related to the general decrease in brain weight of PhB-treated animals and may interfere with normal brain maturation especially at the moment of acquisition of sensory functions such as audition. The results of the present study are also in accordance with previously shown locomotor activity and learning deficits in adult animals exposed to a chronic barbiturate treatment. They also confirm that P17 may be a particulary sensitive and vulnerable period of rat brain development.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to express their gratitude to Pr P. Vert, Director of INSERM U 272 for his encouragement, advice and support. This work was made possible by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U272) and from the Fondation pour la Recherche Médicale (Comité Lorraine). The authors wish to thank L. Gouret for editorial assistance in the preparation of the manuscript.

REFERENCES

1. Abrams, R.M., Ito, M., Frisinger, J.E., Patlack, C.S., Pettigrew, K.D. and Kennedy, C., Local cerebral glucose utilization in fetal and neonatal sheep, Am. J. Physiol., 246 (1984) R608-R618.
2. Armitage, S.G., The effects of barbiturates on the behavior of rat offspring as measured in learning and reasoning situations, J. Comp. Physiol. Psychol., 45 (1952) 146-152.
3. Chugani, H.T., Phelps, M.E. and Mazziotta J.C., Positron emission tomography study of human brain functional development, Ann. Neurol., 22 (1987) 487-497.
4. Cocks, JA, Balazs, R., Johnson, A.L. and Eayrs, J.T., Effect of thyroid hormone on the biochemical maturation of rat brain : conversion of glucose-carbon into amino acids, J. Neurochem., 17 (1970) 1275-1285.
5. Cohen, P.J., Alexander, S.C., Smith, T.C. and Wollman, H., Effects of hypoxia and normocarbia on cerebral blood flow and metabolism in conscious man, J. Appl. Physiol, 23 (1967) 183-189.
6. Crowley, D.E. and Hepp-Reymond, M.C., Development of cochlear function in the ear of the infant rat, J. Comp. Psychol., 62 (1966) 427-432.
7. DeVivo, D.C., Leckie, M.P. and Agrawal, H.C., The differential incorporation of ß-hydroxybutyrate and glucose into brain glutamate in the newborn rat, Brain Res., 55 (1973) 485-490.
8. DeVivo, D.C., Leckie, M.P. and Agrawal, H.C., D-ß-Hydroxybutyrate: a major precursor of amino acids in developing rat brain, J. Neurochem., 25 (1975) 161-170.
9. Diaz, J. and Schain, R.J., Chronic phenobarbital administration : effects upon brain growth and behavior of artificially reared rats, Proc. West. Pharmacol. Soc., 20 (1977) 153-157.
10. Diaz, J., Schain, R.J. and Bailey, B.G., Phenobarbital-induced brain growth retardation in artificially reared rat pups, Biol. Neonate, 32 (1977) 77-82.
11. Douglas, R.J., Transposition novelty and limbic lesions, J. Comp. Psychol., 62 (1966) 354-357.

12. Douglas, R.J., The development of hippocampal function. In R.L. Isaacson and K.H. Puibran (Eds.), The Hippocampus Vol 2, Plenum Press, New York, 1975, pp. 327-361.
13. Eayrs, J.T., The cerebral cortex of normal and hypothyroid rats, Acta Anat. (Basel), 25 (1955) 160-183.
14. Fazekas, J.F., Graves, F.B. and Alman, R.W., Influence of thyroid hormone on cerebral metabolism, Endocrinology, 48 (1951) 169-174.
15. Gaitonde, M.K. and Richter, D., Changes with age in the utilization of glucose carbon in liver and brain, J. Neurochem., 13 (1966) 1309-1318.
16. Hamer, J., Hoyer, S., Alberti, E. and Weinhardt, F., Cerebral blood flow and oxidative brain metabolism during and after moderate and profound arterial hypoxia, Acta Neurochir., 33 (1978) 141-150.
17. Hannah, R.S., Roth, S.H. and Spira, A.W., The effect of chlorpromazine and phenobarbital on cerebellar Purkinje cells, Teratology, 26 (1982) 21-25.
18. Hannah, R.S., Roth, S.H. and Spira, A.W., Effect of phenobarbital on Purkinje cell growth patterns in the rat cerebellum, Exp. Neurol., 100 (1988) 354-364.
19. Hawkins, R.A., Williamson, D.H. and Krebs, H.A., Ketone body utilization by adult and suckling rat brain in vivo, Biochem. J., 122 (1971) 13-18.
20. Jolley, M.E., Stroupe, S.D., Schwenzer, K.S., Wang, C.J., Lu-Steffes, M., Hill, H.D., Popelka, S.R., Holen, J.T. and Kelso D.M., Fluorescence polarization immunoassay. III. An automated system, Clin. Chem., 27 (1981) 1575-1579.
21. Kennedy, C., Grave, J.D., Jehle, J.W. and Sokoloff, L., Changes in blood flow in the component structures of the dog brain during postnatal maturation, J. Neurochem., 19 (1972) 2423-2433.
22. Kennedy, C., Sakurada, O., Shinohara, M. and Miyaoka, M., Local cerebral glucose utilization in the newborn macaque monkey, Ann. Neurol., 12 (1982) 333-340.
23. Kirk, R.E., Experimental Design: Procedures for the Behavioral Sciences, Brooks/Cole, Belmont, CA, 1968.

24. Lu-Steffes, M., Pittluck, G.W., Jolley, M.E., Panas, H.N., Olive, D.N., Wang, C.H., Nystrom, D.D., Klegan, C.L., Davis, T.P. and Stroupe, S.D., Fluorescence polarization immunoassay. IV. Determination of phenytoin and phenobarbital in human serum and plasma, Clin. Med., 28 (1982) 2278-2282.
25. MacNeill, C. and Bryan, R.M., Regional cerebral glucose utilization transiently increases during mild hypoxia, J. Cerebr. Blood Flow Metabol., 8 (1988) 495-501.
26. McBride, M.C., Rosman, N.P., Davidson, S.J. and Oppenheimer, E.Y., Long-term behavioral effects of phenobarbital in suckling rats, Exp. Neurol., 89 (1985) 59-70.
27. Middaugh, L.D., Santos III, C.A., Zemp, J.W., Effects of phenobarbital given to pregnant mice on behavior of mature offspring, Develop. Psychobiol., 8 (1975) 305-313.
28. Middaugh, L.D., Simpson, L.W., Thomas, T.N. and Zemp, J.W., Prenatal maternal phenobarbital increases reactivity and retards habituation of mature offspring to environmental stimuli, Psychopharmacology, 74 (1981) 349-352.
29. Murai, N., Effect of maternal medication during pregnancy upon behavioral development of offspring, Tohoku J. Exp. Med., 89 (1966) 265-272.
30. Myslivecek, J., Electrophysiology of the developing brain. Central and eastern european contributions. In W.A. Himwich (Ed.), Developmental Neurobiology, Charles C Thomas, Springfield, 1970, pp. 475-527.
31. Nehlig, A., Pereira de Vasconcelos, A. and Boyet, S., Quantitative autoradiographic measurement of local cerebral glucose utilization in freely moving rats during postnatal development, J. Neurosci., 8 (1988) 2321-2333.
32. Nehlig, A., Pereira de Vasconcelos, A. and Boyet, S., Evolution postnatale de l'utilisation cérébrale locale de glucose chez le rat : étude quantitative, Circ. Metabol. Cerveau, 5 (1988) 72-87.
33. Nehlig, A., Pereira de Vasconcelos, A. and Boyet, S., Postnatal changes in local cerebral blood flow measured by the quantitative [^{14}C] iodoantipyrine technique in freely moving rats, J. Cerebr. Blood Flow Metabol., 9 (1989) 579-588.

34. Nehlig, A., Pereira de Vasconcelos, A. and Boyet, S., Evolution du couplage entre le débit sanguin cérébral et l'utilisation cérébrale de glucose chez le rat au cours du développement postnatal, Circ. Metabol. Cerveau, 6 (1989) 140-159.
35. Olton, D.S., Branch, M. and Best, P.J., Spatial correlates of hippocampal unit activity, Exp. Neurol., 58 (1978) 387-409.
36. Olton, D.S. and Samuelson R.J., Rememberance of places passed. Spatial memory in rats, J. Exp. Psychol. Animal Behav. Processes, 2 (1976) 97-116.
37. Patel, A.J. and Balazs, R., Factors affecting the development of metabolic compartmentation in the brain. In S. Berl, D.D. Clarke and D. Schneider (Eds.), Metabolic Compartmentation and Neurotransmission. Relation to Brain Structure and Function, Plenum Press, New York, 1975, pp. 363-383.
38. Patsalos, P.N. and Wiggins, R.C., Brain maturation following administration of phenobarbital, phenytoin and sodium valproate to developing rats or to their dams : effects on synthesis of brain myelin and other subcellular membrane proteins, J. Neurochem., 39 (1982) 915-923.
39. Paxinos, G. and Watson, C., The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press, New York, 1982.
40. Pereira de Vasconcelos, A. and Nehlig, A., Effects of early phenobarbital treatment on the maturation of energy metabolism in the developing rat brain. I Incorporation of glucose carbon into amino acids, Develop. Brain Res., 36 (1987) 219-229.
41. Pereira de Vasconcelos, A., Schroeder, H. and Nehlig, A., Effects of early chronic phenobarbital treatment on the maturation of energy metabolism in the developing rat brain. II Incorporation of ß-hydroxybutyrate into amino acids, Develop. Brain Res., 36 (1987) 231-236.
42. Pick, C.G. and Yanai, J., Long term reduction in spontaneous alternations after early exposure to phenobarbital, Int. J. Develop. Neurosci., 2 (1984) 223-228.
43. Pick, C.G. and Yanai, J., Long term reduction in eight arm maze performance after early exposure to phenobarbital, Int. J. Develop. Neurosci., 3 (1985) 223-227.

44. Schain, R.J. and Watanabe, K., Effects of chronic phenobarbital administration upon brain growth in the infant rat, Exp. Neurol., 47 (1975) 509-515.

45. Schain, R.J. and Watanabe, K., Origin of brain growth retardation in young rats treated with phenobarbital, Exp. Neurol., 50 (1976) 806-809.

46. Sherwood, N.M. and Timiras, P.S., A Stereotaxic Atlas of the Developing Rat Brain, University of California Press, Berkeley, 1970.

47. Siesjö, B.K., Brain Energy Metabolism, John Wiley, New York, 1978, pp. 398-452.

48. Sokoloff, L., Changes in enzyme activities in neural tissues with maturation and development of the nervous system. In F.O. Schmidt (Ed.), The Neurosciences, Third Study Program, MIT Press, Cambridge, 1973, pp. 885-898.

49. Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., DesRosiers, M.H., Patlak, C.S., Pettigrew, K.D., Sakurada, O. and Shinohara, M., The [^{14}C]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 (1977) 897-916.

50. Wiggins, R.C., Myelination : a critical stage in development, Neurotoxicology, 7 (1986) 103-120.

51. Yanai, J., An animal model for the effects of barbiturate on the developement of the central nervous system. In J. Yanai (Ed.), Neurobehavioral Teratology, Elsevier, Amsterdam, 1984, pp. 111-132.

52. Yanai, J. and Bergman, A., Neuronal deficits in mice following neonatal exposure to barbiturates, Exp. Neurol., 73 (1981) 199-208.

53. Yanai, J., Bergman, A., Shafer, R., Yedwab, G. and Tabakoff, B., Audiogenic seizures and neuronal deficits following early exposure to barbiturate, Dev. Neurosci., 4 (1981) 345-350.

54. Yanai, J. and Iser, C., Dendritic deficits in the Purkinje cells following early exposure to phenobarbital, Exp. Neurol., 74 (1981) 707-716.

55. Yanai, J., Rosselli-Austin, L. and Tabakoff, B., Neuronal deficits in mice following prenatal exposure to phenobarbital, Exp. Neurol., 65 (1979) 237-244.

Legend of Figure

Figure 1

Influence of phenobarbital on the percentage of variation from control of LCMRglc in the whole brain and representative structures at different developmental stages in the rat.

Abbreviations : WA : weighted average of cerebral glucose utilization ; FPAM : frontoparietal cortex, motor area ; FPASS : frontoparietal cortex, somatosensory area ; VHIP : ventral hippocampus ; DGYR : dentate gyrus ; CBCX : cerebellar cortex ; DENT : dentate nucleus.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.0005$, statistically significant difference from control.

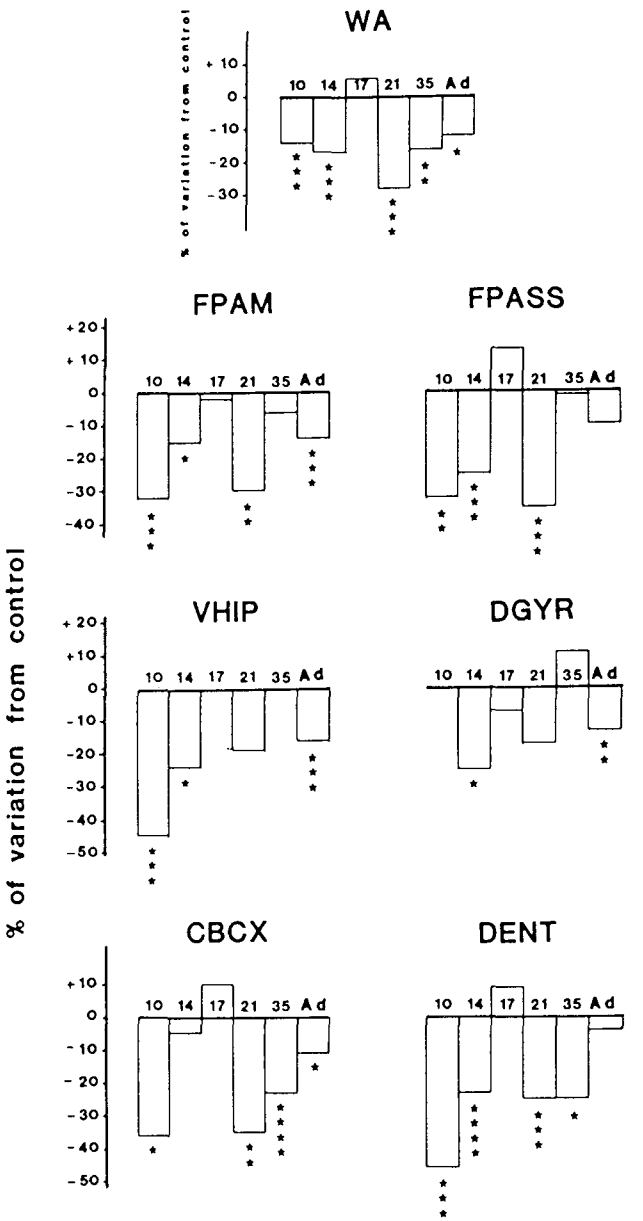

WA
% of variation from control
+10
0
-10
-20
-30
10 14 17 21 35 Ad
FPAM
+20
+10
0
-10
-20
-30
-40
10 14 17 21 35 Ad
FPASS
10 14 17 21 35 Ad
VHIP
+20
+10
0
-10
-20
-30
-40
-50
10 14 17 21 35 Ad
DGYR
10 14 17 21 35 Ad
CBCX
+10
0
-10
-20
-30
-40
-50
10 14 17 21 35 Ad
DENT
10 14 17 21 35 Ad
% of variation from control

Fig. 1

TABLE I : EFFECTS OF PHENOBARBITAL ON PHYSIOLOGICAL VARIABLES OF DEVELOPING RATS.
Values are means ± S.E.M. of the number of animals in parentheses, except for brain weight and plasma PhB levels which are means ± S.E.M. of 5 to 22 animals.

		P10 (n=5)	P14 (n=5)	P17 (n=5)	P21 (n=5)	P35 (n=5)	Adult (n=5)
Body weight (g)	C	24 ± 1	33 ± 2	42 ± 2	49 ± 1	141 ± 5**	422 ± 6**
	PhB	21 ± 1[b]	30 ± 1[a]	38 ± 1[a]	46 ± 1[a]	112 ± 8**[b]	399 ± 8**[a]
Brain weight (g)	C	0.96±0.01	1.22±0.01**	1.31±0.02*	1.44±0.02*	1.71±0.01**	2.11±0.02**
	PhB	0.86±0.01[b]	1.14±0.01**[b]	1.21±0.02*[b]	1.33±0.02*[b]	1.60±0.02**[b]	2.01±0.03**[b]
Plasma glucose concentration (mg/100 ml)	C	127 ± 2	141 ± 6	148 ± 3	131 ± 3	155 ± 8*	155 ± 8
	PhB	96 ± 5[d]	128 ± 5**[a]	147 ± 6*	129 ± 3	140 ± 5	166 ± 5*
Plasma PhB concentration (ug/ml)	PhB	70 ± 3	80 ± 3*	71 ± 8*	53 ± 2**	41 ± 2**	---
Arterial blood pressure (mmHg)	C	50 ± 3	54 ± 2	67 ± 2**	79 ± 2**	102 ± 2**	124 ± 2**
	PhB	51 ± 2	54 ± 1	70 ± 3**	80 ± 2**	106 ± 2**	129 ± 2**
Hematocrit (%)	C	31 ± 1	29 ± 1	24 ± 1**	34 ± 1**	40 ± 1**	46 ± 1**
	PhB	29 ± 2	23 ± 1[b]	24 ± 1	26 ± 1[d]	35 ± 2**[a]	43 ± 1**[a]
Arterial pH	C	7.48±0.02	7.43±0.02	7.48±0.02	7.51±0.01	7.49±0.01	7.43±0.03
	PhB	7.44±0.01	7.47±0.02	7.47±0.02	7.51±0.01	7.48±0.01	7.46±0.02
Arterial pO_2 (mmHg)	C	86 ± 2	86 ± 2	91 ± 1	87 ± 1	86 ± 3	81 ± 2
	PhB	82 ± 3	82 ± 2	82 ± 2[c]	86 ± 2	76 ± 5	82 ± 3
Arterial pCO_2 (mmHg)	C	28 ± 2	35 ± 2*	33 ± 2	30 ± 2	35 ± 1	34 ± 1
	PhB	36 ± 2[a]	38 ± 1	33 ± 4	30 ± 1	37 ± 1*	36 ± 2

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, statistically significant differences from one developmental stage to the preceding one.
a $p < 0.05$, b $p < 0.01$, c $p < 0.005$, d $p < 0.0005$, statistically significant differences between controls (C) and PhB-treated rats at a given stage.

TABLE II : EFFECTS OF PHENOBARBITAL ON LOCAL CEREBRAL GLUCOSE UTILIZATION IN SENSORY SYSTEMS OF DEVELOPING RATS. Values are means ± S.E.M. of the number of animals in parentheses, expressed as umol/100 g/min.

		P10 (n=5)	P14 (n=5)	P17 (n=5)	P21 (n=5)	P35 (n=5)	Adult (n=5)
Auditory system							
Auditory cortex	C	21 ± 1	30 ± 3	45 ± 3**	84 ± 6**	110 ± 4**	171 ± 4**
	PhB	13 ± 2[c]	21 ± 2[a]	51 ± 3**	64 ± 5[a]	110 ± 8**	134 ± 1**[d]
Medial geniculate body	C	23 ± 1	37 ± 4**	45 ± 3	72 ± 6**	97 ± 4**	140 ± 4**
	PhB	13 ± 2[d]	24 ± 1[b]	52 ± 3**	51 ± 6[a]	82 ± 3**[a]	108 ± 2**[d]
Inferior colliculus	C	22 ± 1	52 ± 4**	67 ± 3	101 ± 9**	147 ± 12**	209 ± 9**
	PhB	13 ± 1[c]	35 ± 4[d]	71 ± 6**[a]	70 ± 8[a]	115 ± 12**	155 ± 5**[d]
Lateral lemniscus	C	27 ± 2	52 ± 4**	48 ± 4	77 ± 5**	81 ± 6	110 ± 3**
	PhB	17 ± 1[c]	32 ± 2*[c]	58 ± 5**	54 ± 6[b]	62 ± 4[a]	92 ± 1**[c]
Superior olive	C	36 ± 1	69 ± 6*	60 ± 5	85 ± 7	108 ± 13	143 ± 10*
	PhB	21 ± 2[d]	44 ± 3**[c]	68 ± 5**	69 ± 8	78 ± 3[a]	118 ± 3**[a]
Cochlear nucleus	C	42 ± 2	48 ± 4	52 ± 4	83 ± 2**	98 ± 8	109 ± 4
	PhB	24 ± 3[c]	37 ± 2[a]	62 ± 4**	63 ± 6[b]	79 ± 5*[a]	105 ± 3**
Visual system							
Visual cortex	C	18 ± 1	25 ± 2	34 ± 2	62 ± 4**	86 ± 5**	116 ± 5**
	PhB	11 ± 1[c]	20 ± 1[a]	41 ± 1**[a]	45 ± 2[c]	83 ± 6**	97 ± 1**[c]
Lateral geniculate body	C	20 ± 1	26 ± 2	35 ± 2*	56 ± 2**	70 ± 3**	100 ± 5**
	PhB	12 ± 1[d]	22 ± 1[a]	37 ± 2**	41 ± 4[c]	61 ± 5**	82 ± 3**[c]
Superior colliculus	C	21 ± 1	25 ± 2	33 ± 3	50 ± 2**	70 ± 3**	91 ± 5**
	PhB	12 ± 1[d]	17 ± 1[b]	30 ± 2**	38 ± 4[a]	57 ± 4**[a]	85 ± 2**
Olfactory system							
Olfactory cortex	C	30 ± 2	37 ± 2	41 ± 2	70 ± 4**	86 ± 5**	116 ± 3**
	PhB	19 ± 2[c]	26 ± 1[c]	39 ± 2*	45 ± 4[c]	71 ± 4**[a]	103 ± 3**[a]
Vestibular system							
Vestibular nucleus	C	47 ± 3	51 ± 2	56 ± 3	87 ± 2**	107 ± 8**	119 ± 2
	PhB	24 ± 2[d]	35 ± 2[d]	55 ± 3**	59 ± 5[c]	80 ± 3**[a]	110 ± 3**[a]

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, statistically significant differences from one developmental stage to the preceding one.
a $p < 0.05$, b $p < 0.01$, c $p < 0.005$, d $p < 0.0005$, statistically significant differences between controls (C) and PhB-treated rats at a given stage.

TABLE III : EFFECTS OF PHENOBARBITAL ON LOCAL CEREBRAL GLUCOSE UTILIZATION IN LIMBIC AND FUNCTIONALLY NON SPECIFIC AREAS OF DEVELOPING RATS.
Values are means ± S.E.M. of the number of animals in parentheses, expressed as umol/100 g/min.

		P10 (n=5)	P14 (n=5)	P17 (n=5)	P21 (n=5)	P35 (n=5)	Adult (n=5)
Prefrontal cortex	C	20 ± 1	28 ± 2	34 ± 2	67 ± 4**	90 ± 3**	113 ± 2**
	PhB	13 ± 2[a]	21 ± 1[c]	36 ± 1*	50 ± 2*[c]	78 ± 7**	95 ± 2**[d]
Anterior cingulate cortex	C	20 ± 2	28 ± 1	33 ± 2	64 ± 4**	86 ± 3**	105 ± 3**
	PhB	13 ± 2[b]	21 ± 1[c]	34 ± 2*	47 ± 2*[c]	73 ± 6**[a]	86 ± 2*[d]
Frontoparietal cortex, somatosensory area	C	19 ± 1	32 ± 2	38 ± 2	73 ± 4**	81 ± 3	104 ± 5**
	PhB	13 ± 2[b]	24 ± 1[c]	43 ± 2**	48 ± 4[c]	80 ± 7**	94 ± 3*
Entorhinal cortex	C	20 ± 1	24 ± 2	29 ± 3	45 ± 2**	50 ± 2	62 ± 2**
	PhB	12 ± 2[c]	18 ± 2[a]	30 ± 1*	35 ± 4[a]	53 ± 5**	55 ± 1[a]
Accumbens nucleus	C	21 ± 2	27 ± 2	31 ± 2	56 ± 3**	63 ± 3	65 ± 3
	PhB	12 ± 2[b]	19 ± 1[c]	28 ± 1	33 ± 5[c]	53 ± 4**[a]	54 ± 1[b]
Medial septum	C	23 ± 2	36 ± 2*	34 ± 2	62 ± 3**	72 ± 5	85 ± 3**
	PhB	12 ± 2[c]	20 ± 1[d]	40 ± 2**[a]	43 ± 1[d]	56 ± 3**[a]	78 ± 3**[a]
Lateral septum	C	20 ± 2	26 ± 2	24 ± 2	44 ± 2**	45 ± 4	54 ± 2*
	PhB	11 ± 2[c]	17 ± 1[c]	34 ± 2**[c]	39 ± 1[a]	43 ± 3	58 ± 2**
Medial amygdala	C	21 ± 1	25 ± 1	26 ± 1	41 ± 2**	43 ± 1	49 ± 3
	PhB	12 ± 1[d]	18 ± 1[c]	27 ± 1	30 ± 5[a]	39 ± 4	47 ± 1
Central amygdala	C	20 ± 1	23 ± 2	24 ± 1	36 ± 2**	42 ± 2	43 ± 2
	PhB	12 ± 1[c]	17 ± 1[a]	25 ± 1	27 ± 5	37 ± 3*	39 ± 1
Basolateral amygdala	C	23 ± 1	30 ± 2	33 ± 1	61 ± 3**	68 ± 3	84 ± 3**
	PhB	13 ± 1[d]	22 ± 2[c]	39 ± 1**[c]	45 ± 4[a]	63 ± 4**	74 ± 2*[a]
Dorsal hippocampus	C	26 ± 1	29 ± 2	31 ± 1	49 ± 4**	59 ± 2*	72 ± 1**
	PhB	15 ± 2[c]	23 ± 1[b]	33 ± 1	37 ± 3[a]	55 ± 5**	67 ± 1*[b]
Ventral hippocampus	C	29 ± 2	29 ± 3	34 ± 2	48 ± 3**	56 ± 3	76 ± 3**
	PhB	16 ± 3[c]	22 ± 2[a]	34 ± 1*	39 ± 4	56 ± 4**	64 ± 2[c]
Dentate gyrus	C	---	24 ± 2	28 ± 2	36 ± 2*	36 ± 1	52 ± 2**
	PhB	---	18 ± 2[a]	26 ± 1	30 ± 3	40 ± 3**	45 ± 1[b]
Mediodorsal thalamus	C	25 ± 1	30 ± 2	37 ± 1	69 ± 4**	81 ± 3	105 ± 5**
	PhB	15 ± 2[c]	23 ± 1[a]	39 ± 3	41 ± 3[d]	65 ± 5**[a]	94 ± 3**[a]
Medial habenula	C	51 ± 2	55 ± 1	56 ± 3	73 ± 3**	71 ± 4	68 ± 2
	PhB	36 ± 2[c]	45 ± 3[c]	53 ± 2	56 ± 3[c]	58 ± 4[a]	63 ± 1[a]
Lateral habenula	C	35 ± 3	44 ± 1	53 ± 3	84 ± 3**	97 ± 4**	101 ± 2
	PhB	21 ± 1[c]	32 ± 1*[d]	50 ± 2**	54 ± 3[d]	71 ± 4**[b]	94 ± 2**[a]
Interpeduncular nucleus	C	44 ± 2	51 ± 3	56 ± 3	79 ± 3**	86 ± 2	115 ± 4**
	PhB	42 ± 4	60 ± 2*[a]	78 ± 5*[c]	79 ± 5	103 ± 5**[b]	92 ± 1[d]
Ventral tegmental area	C	30 ± 2	36 ± 3	40 ± 3	57 ± 3**	56 ± 4	65 ± 2
	PhB	16 ± 1[d]	25 ± 2*[b]	43 ± 3**	49 ± 3[a]	51 ± 2	61 ± 3*
Dorsal tegmentum	C	41 ± 3	42 ± 2	41 ± 3	76 ± 4**	98 ± 10*[c]	103 ± 5
	PhB	22 ± 3[d]	28 ± 2[d]	46 ± 2**	52 ± 2[d]	64 ± 4*[a]	97 ± 3**
Mesencephalic reticular formation	C	24 ± 2	29 ± 2	36 ± 3	54 ± 2**	64 ± 3*	75 ± 2*
	PhB	13 ± 1[c]	19 ± 2[c]	41 ± 3**	45 ± 1[c]	50 ± 3[b]	73 ± 1**
Medial raphe	C	35 ± 2	41 ± 2	39 ± 2	78 ± 3**	86 ± 6	109 ± 2**
	PhB	18 ± 2[d]	27 ± 2[d]	47 ± 3**[a]	53 ± 3[d]	68 ± 4**[a]	99 ± 3**[a]
Dorsal raphe	C	29 ± 2	36 ± 2	36 ± 4	71 ± 3**	78 ± 4	102 ± 2**
	PhB	15 ± 2[d]	24 ± 1[c]	44 ± 2**	50 ± 3[c]	61 ± 4*[a]	94 ± 2**[a]
Locus coeruleus	C	31 ± 2	37 ± 2	35 ± 2	59 ± 2**	70 ± 3**	70 ± 1
	PhB	18 ± 1[d]	23 ± 2[d]	43 ± 3**[a]	48 ± 2[c]	55 ± 2[b]	72 ± 2**
Pontine gray	C	22 ± 1	28 ± 1	28 ± 1	51 ± 3**	51 ± 2	67 ± 2**
	PhB	13 ± 2[c]	17 ± 1[d]	33 ± 2**	33 ± 3[c]	41 ± 3[a]	61 ± 1**[a]

p < 0.05, ** p < 0.01, statistically significant difference between one developmental stage and the preceding one.
p < 0.05, b p < 0.01, c p < 0.005, d p < 0.0005, statistically significant difference between controls (C) and PhB-treated rats at a given stage.

TABLE IV : EFFECTS OF PHENOBARBITAL ON LOCAL CEREBRAL GLUCOSE UTILIZATION IN THE HYPOTHALAMUS OF DEVELOPING RATS.
Values are means ± S.E.M. of the number of animals in parentheses, expressed as umol/100 g/min.

		P10 (n=5)	P14 (n=5)	P17 (n=5)	P21 (n=5)	P35 (n=5)	Adult (n=5)
Anterior hypothalamus	C	20 ± 1	23 ± 1	25 ± 2	49 ± 3**	52 ± 3	56 ± 3
	PhB	11 ± 1[c]	19 ± 1*[a]	33 ± 2**[a]	36 ± 1[c]	41 ± 3[a]	58 ± 3**
Paraventricular nucleus	C	26 ± 3	27 ± 2	27 ± 3	46 ± 3**	50 ± 3	52 ± 2
	PhB	16 ± 2[a]	23 ± 2	33 ± 2*	41 ± 1	44 ± 3	52 ± 3
Ventromedian hypothalamus	C	19 ± 1	22 ± 2	23 ± 2	42 ± 2**	49 ± 3	47 ± 3
	PhB	12 ± 1[c]	17 ± 1[a]	32 ± 3**[a]	33 ± 1[c]	38 ± 2[a]	53 ± 2**
Dorsomedian hypothalamus	C	25 ± 2	27 ± 2	30 ± 3	51 ± 4**	60 ± 4	55 ± 3
	PhB	15 ± 1[d]	19 ± 2[c]	38 ± 3**[a]	43 ± 2[a]	46 ± 3[a]	64 ± 3**[a]
Posterior hypothalamus	C	19 ± 1	23 ± 2	27 ± 3	45 ± 2**	50 ± 4	46 ± 1
	PhB	13 ± 1[c]	18 ± 1	34 ± 3**	34 ± 1[c]	35 ± 2[b]	51 ± 1**[b]
Mammillary body	C	27 ± 1	40 ± 3	54 ± 3	97 ± 6**	108 ± 4	146 ± 5**
	PhB	17 ± 2[c]	28 ± 2*[c]	48 ± 2**	58 ± 4[d]	71 ± 4*[d]	115 ± 2**[d]

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ statistically significant differences from one developmental stage to the preceding one.
a $p < 0.05$, b $p < 0.01$, c $p < 0.005$, d $p < 0.0005$, statistically significant differences between controls (C) and PhB-treated rats at a given stage.

TABLE V : EFFECTS OF PHENOBARBITAL ON LOCAL CEREBRAL GLUCOSE UTILIZATION IN MOTOR AREAS OF DEVELOPING RATS.
Values are means ± S.E.M. of the number of animals in parentheses, expressed as umol/100 g/min.

		P10 (n=5)	P14 (n=5)	P17 (n=5)	P21 (n=5)	P35 (n=5)	Adult (n=5)
Striatal circuits							
Frontoparietal cortex, motor area	C	22 ± 2	34 ± 2	45 ± 5	66 ± 5**	81 ± 2*	107 ± 2**
	PhB	15 ± 1[c]	29 ± 2*[a]	44 ± 3*	46 ± 4[b]	76 ± 6**	92 ± 3*[c]
Dorsomedian caudate nucleus	C	21 ± 3	30 ± 2	37 ± 3	65 ± 2**	82 ± 5**	106 ± 3**
	PhB	12 ± 1[b]	23 ± 2[b]	37 ± 2	42 ± 4[c]	77 ± 7**	90 ± 3[c]
Globus pallidus	C	21 ± 2	24 ± 2	28 ± 2	39 ± 2**	46 ± 1*	58 ± 2**
	PhB	12 ± 2[c]	20 ± 1[a]	27 ± 2	30 ± 4[a]	41 ± 4*	49 ± 2[c]
Substantia nigra pars compacta	C	31 ± 3	35 ± 2	39 ± 3	58 ± 3**	66 ± 4	75 ± 1
	PhB	16 ± 1[d]	25 ± 2*[c]	42 ± 3**	47 ± 3[b]	51 ± 2[b]	69 ± 2**[a]
Substantia nigra pars reticulata	C	27 ± 4	29 ± 2	35 ± 3	53 ± 2**	57 ± 4	61 ± 1
	PhB	15 ± 1[b]	23 ± 2*[a]	39 ± 3**	44 ± 3[a]	50 ± 2	63 ± 1**
Subthalamic nucleus	C	28 ± 2	34 ± 2	38 ± 3	63 ± 2**	74 ± 2*	87 ± 1**
	PhB	15 ± 1[d]	24 ± 1*[c]	42 ± 3	47 ± 2**[d]	57 ± 3**[b]	86 ± 2**
Ventroanterior thalamus	C	28 ± 1	34 ± 2	43 ± 3	71 ± 4**	83 ± 2**	103 ± 2**
	PhB	17 ± 2[c]	24 ± 1[c]	47 ± 3**	44 ± 3[d]	64 ± 4**[c]	86 ± 6**[a]
Ventrolateral thalamus	C	28 ± 1	32 ± 2	40 ± 3	56 ± 4**	72 ± 5*	94 ± 5**
	PhB	17 ± 2[c]	26 ± 2[a]	36 ± 3	36 ± 5[c]	56 ± 2**[b]	83 ± 2**[a]
Cerebellar circuits							
Red nucleus	C	32 ± 2	37 ± 3	42 ± 3	59 ± 2**	71 ± 5*	85 ± 2*
	PhB	15 ± 2[d]	24 ± 2*[c]	43 ± 3**	47 ± 3[c]	54 ± 2[a]	80 ± 1**[a]
Inferior olive	C	38 ± 1	41 ± 3	51 ± 3	66 ± 3*	84 ± 5**	85 ± 3
	PhB	22 ± 2[d]	34 ± 2**	49 ± 2**	52 ± 3[c]	65 ± 2**[a]	81 ± 3**
Cerebellar cortex	C	28 ± 3	20 ± 2	20 ± 1	32 ± 3**	44 ± 1**	55 ± 3**
	PhB	18 ± 3[a]	19 ± 2	22 ± 1	21 ± 3[b]	34 ± 2**[d]	49 ± 2**[a]
Cerebellar nuclei							
Dentate nucleus	C	31 ± 3	39 ± 1	42 ± 2	67 ± 2**	85 ± 6**	97 ± 3
	PhB	17 ± 2[c]	30 ± 1**[d]	46 ± 2**	50 ± 3[c]	64 ± 3**[a]	93 ± 2**
Interpositus nucleus	C	35 ± 3	39 ± 2	44 ± 2	68 ± 2**	84 ± 4**	92 ± 1
	PhB	18 ± 2[c]	31 ± 1**[c]	48 ± 2**	51 ± 3[c]	62 ± 3*[b]	91 ± 2**
Fastigial nucleus	C	35 ± 2	39 ± 2	42 ± 2	71 ± 2**	82 ± 5	94 ± 3*
	PhB	19 ± 2[d]	31 ± 1**[c]	48 ± 2**[a]	53 ± 3[c]	62 ± 2*[b]	91 ± 2**

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, statistically significant differences from one developmental stage to the preceding one.
a $p < 0.05$, b $p < 0.01$, c $p < 0.005$, d $p < 0.0005$, statistically significant differences between controls (C) and PhB-treated rats at a given stage.

TABLE VI : EFFECTS OF PHENOBARBITAL ON LOCAL CEREBRAL GLUCOSE UTILIZATION IN WHITE MATTER AREAS OF DEVELOPING RATS.
Values are means ± S.E.M. of the number of animals in parentheses, expressed as umol/100 g/min.

		P10 (n=5)	P14 (n=5)	P17 (n=5)	P21 (n=5)	P35 (n=5)	Adult (n=5)
Genu of corpus callosum	C	20 ± 2	21 ± 1	23 ± 2	27 ± 1	24 ± 2	21 ± 1
	PhB	12 ± 3[a]	16 ± 1[a]	22 ± 2	23 ± 3	24 ± 1	20 ± 1
Internal capsule	C	19 ± 2	21 ± 1	24 ± 1	34 ± 1**	28 ± 2	28 ± 2
	PhB	12 ± 2[b]	18 ± 1	25 ± 1*	27 ± 3[a]	29 ± 2	24 ± 1
Cerebellar white matter	C	---	---	---	---	46 ± 6	39 ± 2
	PhB	---	---	---	---	37 ± 3	32 ± 1[c]
Weighted average	C	21 ± 1	26 ± 1	29 ± 1	47 ± 2*	55 ± 3	68 ± 4*
	PhB	18 ± 1[c]	19 ± 1[c]	31 ± 1*	34 ± 1[c]	46 ± 2*[b]	60 ± 3*[a]

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, statistically significant differences from one developmental stage to the preceding one.
a $p < 0.05$, b $p < 0.01$, c $p < 0.005$, statistically significant differences between controls (C) and PhB-treated rats at a given stage.

MEMOIRE E

INFLUENCE OF EARLY NEONATAL PHENOBARBITAL EXPOSURE ON CEREBRAL ENERGY METABOLISM AND BEHAVIOR

Anne Pereira de Vasconcelos*[1], Catherine Colin[|], Didier Desor[|], Michel Divry[|] and Astrid Nehlig*

* INSERM U272
Université de Nancy I
30 rue Lionnois
B.P. 3137
54013 NANCY Cédex
FRANCE
Phone number : 83.37.35.59

| CNRS UA 233
Université de Nancy I
Bd des Aiguillettes
B.P. 239
54506 VANDOEUVRE Cédex
FRANCE

1. to whom all correspondence should be addressed.

Short title : Phenobarbital, cerebral energy metabolism and behavior

Key words : Phenobarbital ; Barbiturate ; Chronic treatment ; Locomotor activity ; spontaneous alternation ; Eight arm maze ; 2-[^{14}C]Deoxyglucose ; Cerebral energy metabolism.

ABSTRACT

The influence of an early chronic phenobarbital (PhB) exposure on local cerebral glucose utilization (LCGU) and on behavior was studied in the rat. The animals were treated from postnatal day 2 to 35 by a daily injection of 50 mg/kg PhB or by saline and tested between 10 and 35 days for short-term effects of the drug on LCGU and between 70 and 90 days for long-term effects of PhB on LCGU and behavior. PhB induced short- and long-lasting reductions in the overall rates of LCGU in hippocampal and cerebellar areas, but no significant changes in LCGU in the different cell layers of these two cerebral areas. PhB also changed the pattern of maturation of the rates of LCGU as compared to control subjects. The barbiturate treatment induced a decrease in the exploratory behavior of PhB- as compared to saline-treated rats in the open field, as well as significant 25 % decrease in the rate of spontaneous alternation with delay. In addition, PhB-treated rats needed significantly more time than control animals to perform their trials in the non-rewarded T maze testing. However, the neonatal barbiturate exposure did not induce changes in performances of adult rats in the rewarded eight arm maze. The results of the present study show that there is no apparent correlation between the rates of energy metabolism in the hippocampus and the impairment of learning abilities of adult rats in behavioral tests related to the hippocampus.

INTRODUCTION

Phenobarbital (PhB) is an anticonvulsant drug currently prescribed both to epileptic mothers, even during their pregnancy, and to neonates for prevention and therapy of convulsive disorders. However, chronic administration of PhB to pregnant rodents or to their offspring has been shown to induce a decrease in body and brain weights (4,30,35,40,43). This reduction in brain weight is associated with long-lasting cellular destructions, mainly at the level of cerebellar Purkinje cells and hippocampal pyramidal cells. The cellular damage appears whether barbiturate treatment has been pre- or postnatal, indicating that PhB is able to disturb neuronal differentiation as well as to destroy already formed neurons (10,11,39-43).

In previous experiments from our laboratory, we showed that an early chronic PhB treatment is also able to induce a shift in the cerebral energy metabolism balance. Indeed, in rat pups exposed to PhB from day 2 to 35, the biosynthesis of cerebral amino acids from glucose is reduced whereas that from ß-hydroxybutyrate is simultaneously increased over the whole period of pharmacological treatment. These changes appear in the three cerebral structures studied, cerebral cortex, subcortical areas and cerebellum. However, this shift in the cerebral energy metabolism balance does not have any incidence on brain amino acid levels (24,30,31). Nevertheless, it has not been proven yet whether the brain is able to overcome this apparently prolonged period of immaturity, translating into a longer dependency upon ketone bodies as substrates for energy metabolism and biosynthesis without any long-term alterations in brain function, especially in behavior and learning capacities.

Indeed, it has been shown that an early chronic administration of PhB is able to induce behavioral alterations in the adult rat. So, disturbances in the locomotor activity of rodents (4,20) as well as deficits in the learning capacities in different kinds of mazes have been reported (1,19,21,32,33). The intensity of these alterations varies as a function of the dose, the period and the duration of the treatment.

According to these results, the purpose of the present study was to control on one hand if an early chronic PhB treatment in the rat is able to induce short- and/or long-term changes in the rates of local cerebral glucose utilization (LCGU) in the areas whose cells have been shown to be most PhB-sensitive, i.e. the hippocampus and the cerebellum. LCGU was measured by means of the quantitative autoradiographic 2-[^{14}C]deoxyglucose method of Sokoloff et al. (38) recently adapted to the developing rat (22). On the other hand, we recorded the influence of an early barbiturate exposure on the behavior of adult rats, mainly locomotor activity in an open field and learning capacities in a T maze and in an eight arm maze. These two tests have a spontaneous alternation component which is well known to be related to the hippocampus (6,7). The study was performed in rats exposed to PhB from postnatal day 2 to 35. Short-term effects of the pharmacological treatment on LCGU were studied from day 10 to 35 and long-term effects of PhB on LCGU and behavior were measured in adult rats (70-90 days) previously exposed to the barbiturate. PhB therapy was applied from postnatal day 2 to 35, in order to encompass the whole period of postnatal development. Indeed, by 30 days, the complexity and density of dendritic arborization is approaching that of the adult rat (8).

MATERIALS AND METHODS

Local cerebral glucose utilization

Animals

Adult Sprague-Dawley rats, one male and two females by cage, were housed together in mating groups for 5 days and constantly maintained under standard laboratory conditions on a 12:12 h light/dark cycle (lights on at 6:00 h). Food and water were available ad libitum. After delivery, litter sizes were reduced to 10 pups for homogeneity. Sodium phenobarbital (5-ethyl-5-phenylbarbituric acid, sodium salt, Fluka, Buchs, Switzerland), dissolved in saline was administered subcutaneously to the pups from day 2 to 35 after birth, daily at a dose of 50 mg/kg. Control animals received the same volume of saline. Rat pups were weaned at postnatal day 21 (P21). The experiments were performed on a total number of 60 rats, 30 saline- and 30 PhB-treated animals at 10, 14, 17, 21 and 35 days after birth and at the adult stage at about 3 h after the injection of the drug. Before weaning, both male and female rat pups were used, but only male animals were used after weaning.

A femoral artery and vein were catheterized with polyethylene catheters under light halothane anesthesia. Both catheters were threaded under the skin, up to the neck through a small opening in the skin. A loop was made with the end of each catheter, which were put back under the skin, and the small opening in the skin was closed. The animals were returned to their normal environment, back to their mother for suckling rats and allowed food and water ad libitum. The experiments were performed on the following day. Only those animals that did not suffer from the surgery and did not loose weight (especially for suckling rats which were sometimes rejected by the mother) were used for the study.

Measurement of local cerebral glucose utilization

On the day of the experiment, the rats were transferred to an uncovered plastic box of variable size according to the stage studied, allowing free access to the catheters as well as free movement of the animals. The threads on the skin in the neck were cut and the catheters were pulled out.

Rates of LCGU were measured by the 2-[^{14}C]deoxyglucose (2DG) method described by Sokoloff et al. (38) and applied to the developing rat (22). The 2-[^{14}C]deoxyglucose (125 µCi/kg ; spec. act., 45-60 mCi/mmol ; Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, France) was injected as an i.v. pulse. Nine to 20 timed arterial blood samples were drawn during the following 45 min in glass capillary tubes for developing animals and in plastic tubes for adult rats. The volumes of the samples ranged from 10 to 75 µl according to the animal's age. The blood samples were immediately centrifuged in a Hettich Microrapid microfuge and the plasma concentration of 2DG was determined by liquid scintillation counting on 3-20 µl samples (Beckman scintillation counter model LS 1801 ; Beckman Instruments, Fullerton, CA). Plasma glucose concentrations were assessed from 10 µl samples by means of a Beckman glucose analyzer, on 3 larger samples from immature animals and all samples from adult rats.

At approximately 45 min after the pulse of 2-[^{14}C]deoxyglucose, the animals were killed by decapitation. Brains were rapidly removed and frozen in isopentane chilled to -35°C, coated with chilled embedding

medium (carboxymethylcellulose 4 % in water), and stored at - 80°C in plastic bags until sectioned and autoradiographed. The brains were then cut into 20 µm coronal sections at - 22°C in a cryostat. Sections were picked up on glass coverslips and dried on a hot plate (60°C). Sections were autoradiographed on Kodak SB5 film along with calibrated [^{14}C]methylmethacrylate standards (Amersham, Arlington Heights, IL), using a special set of low ^{14}C concentration standards for animals 10-, 14- and 17-day old. All standards were calibrated for their ^{14}C concentration in brain sections as previously described (38). Adjacent sections were fixed and stained with thionin for histological identification of specific nuclei.

The autoradiographs were analyzed by quantitative densitometry with a computerized image processing system (Biocom 200, France) or a manual microdensitometer (Macbeth, TD901, Kollmorgen Co., Newburgh, NY). Optical density measurements for each structure anatomically defined according to the rat brain atlas of Paxinos and Watson (28) for adult animals and to the developing rat brain atlas of Sherwood and Timiras (36) for all other stages were made bilaterally in a minimum of 4 brain sections. All densitometry was conducted without knowledge of the treatment of the animal. Tissue ^{14}C concentrations were determined from the optical densities of the autoradiographic representations of the tissues and a calibration curve obtained from the autoradiographs of the calibrated standards. For the final calculations, the exact time of blood sampling was corrected for the time lag due to the residual volume of blood in the catheter. The lag was calculated from the value of the volume of the arterial catheter and the blood flow rate of each animal. The lag ranged from 2 to 6 s and was substracted from the recorded time of sampling. Rates of LCGU were then calculated from the local tissue concentration of ^{14}C, the time courses of the plasma 2DG and glucose concentrations, and the appropriate constants according to the operational equation of the method (22,23,38).

Plasma phenobarbital measurement

Plasma PhB levels were measured by radiative energy attenuation applied to fluorescence polarization immunoassay by means of a TDX analyzer (Abbott Instruments, Wiesbaden, F.R.G.), according to the method described by Jolley et al. (15) and Lu-Steffes et al. (17).

Physiological functions

Just prior to the administration of the 2DG pulse, mean arterial blood pressure was measured with an air-damped mercury manometer. Suckling rat pups were maintained under a heating lamp to keep their body temperature in the physiological range. Hematocrit was determined from blood samples collected into capillary tubes at about 30 min after isotope injection. Just before sacrifice of the animals, a sample of 40 or 80 µl of arterial blood was taken for analysis of blood pH, pO_2 and pCO_2, which were measured with a blood gas analyzer (Corning, model 158, Corning Medical and Scientific, Halstead, England).

Statistical analysis

LCGU was determined in 19 structures in 12 groups of 5 animals each, 6 groups of controls, and 6 groups of PhB-treated rats. The values of LCGU obtained for each structure underwent three statistical analyses. First, a two-way analysis of variance was performed, following the procedure described by Kirk (16) to test the effects of the age, of the nature of the treatment and the effects of the age versus the nature of the pharmacological treatment. In the second analysis, to test the age effects LCGU in each group of either saline- or PhB-exposed animals was compared to the values in the immediate preceding stage by means of a Bonferroni multiple comparison procedure (16). These conservative multiple comparison procedures were chosen to reduce the likelihood of type II errors in view of the number of statistical procedures performed. In the third analysis, to test the effects of the treatment, at each stage, values of LCGU in the PhB-treated group were compared with those in the control group by means of a Student's t-test.

Behavioral studies

Animals

For the study, animals were raised, reproduced and treated as described for the measurement of LCGU. Twelve saline- and 12 PhB-treated litters were used for the study. The animals were studied at the age of 70-90 days. All measurements were performed at the beginning of the dark period of the cycle. Illumination was provided by a red incandescent lamp placed in such a way that all the parts of the open field apparatus were uniformly illuminated and that the goal arms of the two mazes were visually identical.

Open field behavior

Eleven controls and 14 PhB-treated rats were tested in a square open field enclosure (90 x 90 cm) with the floor divided into 36 squares (15 x 15 cm), 20 peripheral, 12 median and 4 central squares. Each animal was gently placed in one corner of the open field, always facing the same direction. The number of peripheral, median or central squares entered (both forepaws placed in a given square), as well as the number of rearings (both forepaws off the floor) and grooming activity were recorded for 5 min by two trained observers, one of whom was unaware of the animal's group assignment.

Spontaneous alternation procedure

Fifty six controls and 56 PhB-treated rats were tested for spontaneous alternation. The test was conducted in a T maze built of wood painted in neutral gray colour with walls 15 cm high, a start box (15 x 15 cm), a stem (35 x 15 cm) and two arms (50 x 15 cm each). On each trial, an animal was placed in the start box closed by a guillotine door. The door was raised to allow free access to the maze when the animal faced the door. As soon as the rat had reached one of the goal arms (all four paws upon the arm), it was taken out of the maze and

placed back in the starting box. Animals were allowed only one alternation (two entrances) each day during 5 consecutive days. If a rat did not complete a trial within a maximal time of 5 min, it was considered as a failure on that day.

The experimental animals were divided into two groups. Half of the rats (28 controls and 28 PhB-treated rats) were tested with no interposed intertrial delay (no delay condition) and for the other half of the animals (28 controls and 28 PhB-treated rats) there was a 30 s intertrial retention in the start box (delay condition). The latency from start box release to goal box entry was also recorded during the experiment.

Eight arm maze procedure

Sixteen controls and 16 PhB-treated rats were tested in a eight arm maze. They were food deprived to 85 % of their body weight at the start of testing and maintained at this weight level during the duration of the test. The apparatus was a woden gray enclosed eight arm radial maze with walls but no top. Each of the arms (60 x 12 x 17 cm, length x width x height) projected from one side of an octogonal center platform measuring 50 cm diameter. Food pellets (45 mg) were positioned at the far end of each arm. Prior to each trial, every arm of the maze was baited with a food pellet. Reinforcement was not replaced during the test so that a maximum of 8 pieces of food could be obtained. At the beginning of each test, the rat was placed in the center platform facing the same arm for all trials and for all rats. The animals were left in the maze until they had either entered all the 8 arms or until 15 min had elapsed, whichever occured first. Placing all 4 paws in an arm was recorded as an arm entrance. Times of arm entrances, the identity of each arm visited and the serial order in which the rat was entered were recorded. All rats were tested for 5 days, with one test on each day. Animals that did not reach criterion (obtaining 8 rewards within the allotted time i.e. 15 min) were taken out of the maze and eliminated from the experiment.

Statistical analysis

The data of open field behavior were analyzed by Mann-Whitney U-test and one way analysis of variance and the data of spontaneous alternation procedure were analyzed by Student's t-test, Chi square test and Mann-Whitney U-test. The data of radial maze performance were analyzed by Mann-Whitney U-test (37).

RESULTS

METABOLIC STUDIES

Physiological variables

As shown in Table 1, body and brain weights of the animals significantly increased in both groups between P21 and P35 and again between P35 and the adult stage. Body and brain weights were also significantly both reduced by 6 to 21 % according to the stage studied in PhB-treated rats as compared to controls. Plasma glucose

concentration significantly increased between P21 and P35 in control animals and more regularly over the period studied in PhB-treated rats. Arterial blood pressure significantly increased after P14 but remained the same in both groups at all studied stages. Hematocrit value regularly increased after P14 in control animals and after P21 in PhB-treated rats. Hematocrit values were significantly lower in PhB- than in saline-treated rats at P14, P21, P35 and at the adult stage.

Arterial pH values were not influenced either by age or by the nature of the treatment. It was the same for pO_2 values in control rats but in PhB-treated animals, pO_2 underwent a significant decrease at P17 followed by an increase at P21. At P17 pO_2 value was also significantly lower in PhB- than in saline-exposed rats. PCO_2 values significantly increased between P10 and P14 in control rats and were significantly higher in PhB- than in saline-treated rats at P10.

Local cerebral glucose utilization

The early chronic PhB administration induced a statistically significant and general decrease in LCGU in most structures studied at all developmental stages, except at P17 (Student's t-test). This was reflected by a 12 to 43 % decrease in the value of the average rate of glucose utilization for the brain as a whole weighted for the masses of its component parts in PhB- as compared to saline-treated rats, except at P17 where average brain glucose utilization was similar in both groups of animals (Fig. 1). Whole brain weighted average glucose utilization significantly increased between P17 and P21 and also between P35 and the adult stage in the saline group, whereas it significantly increased between P14 and P17, between P21 and P35, and between P35 and the adult stage in PhB-treated rats (Bonferroni's t-test).

Two-way analysis of variance

The data of the two-way analysis of variance which are not given in the Figures 2 and 3 indicate that the effect of either the age or the nature of the treatment was significant in the 7 areas studied ($P < 10^{-4}$). The effects of the age versus the pharmacological treatment reached significance only in the dentate gyrus and the three cerebellar nuclei where P value ranged from 0.02 to 8.10^{-4}. On the opposite, there was no interaction between age and treatment in the dorsal and ventral hippocampus and the cerebellar cortex.

Postnatal evolution of local cerebral glucose utilization in saline- and PhB- treated rats (Bonferroni's t-test)

In saline-treated rats, levels of LCGU did not change between P10 and P17 (Figs. 2 and 3). LCGU significantly increased between P17 and P21 in all structures studied. Between P21 and P35, LCGU in control rats significantly increased in dorsal hippocampus, cerebellar cortex and in dentate and interpositus nuclei. Between P35 and the adult stage, LCGU significantly increased in the three hippocampal areas (Fig. 2) and in the cerebellar cortex and the fastigial nucleus (Fig. 3).

In PhB-exposed rats, LCGU significantly increased between P10 and P14 in the three cerebellar nuclei (Fig. 3). Between P14 and P17, LCGU increased in ventral hippocampus (Fig. 2) and in the three cerebellar nuclei. Between P17 and P21, LCGU did not change in any structure

studied. LCGU significantly increased in all areas studied between P21 and P35 and in all structures studied, except in ventral hippocampus and dentate gyrus between P35 and the adult stage.

Influence of phenobarbital treatment on local cerebral glucose utilization at different ages (Student's t-test)

At P10 and P14, LCGU was significantly reduced in PhB- as compared to saline-treated rats in all areas studied except for the cerebellar cortex at P14 (Figs. 2 and 3). At P17, there was no difference in the levels of LCGU between the two groups of animals, except in the fastigial nucleus. At P21 and P35, LCGU was not affected by the treatment in the three hippocampal areas studied, except in dorsal hippocampus at P21. Conversely, at these two stages, LCGU was significantly depressed in the four cerebellar areas studied. Finally, at the adult stage, levels of LCGU were significantly decreased in PhB- as compared to saline-treated rats in the three hippocampal areas and in cerebellar cortex but not affected in cerebellar nuclei.

Hippocampal and cerebellar cellular layers

As shown in Table II, an early chronic PhB treatment did not induce significant decreases in LCGU in hippocampal areas of adult rats. There was only a tendency towards significance ($P < 0.10$) in the hippocampal CA3 pyramidal cells layer. Within cerebellar areas, LCGU was significantly increased in white matter of PhB- as compared to saline-treated rats. There is an apparent contradiction between the results shown in Figs. 2 and 3 and The table II concerning the effects of PhB on LCGU in hippocampus and cerebellum. In fact, the data shown in Figs. 2 and 3 represent readings of wide areas of the hippocampus and the cerebellum including all the different layers presented in Table II and small changes in each individual layer, not significant on its own may be adding to account for the significant difference when the whole area is read at once.

BEHAVIORAL STUDIES

Open field behavior

When tested in the open field apparatus, both saline- and PhB-treated rats ambulated in a normal manner, with no apparent indications of any motor deficits. There were no significant differences between control and PhB-treated rats for any parameter recorded in the open field in the present experimental conditions, i.e., the total number of squares and the number of peripheral, median and central squares entered over the 5 min test as well as for the frequency of rearings and grooming activity over the same period of time (data not shown).

However, the total number of squares entered was significantly lower during the 3rd ($p < 0.02$) and the 4th min ($p < 0.05$) of the 5 min open field test for PhB-treated rats as compared to controls (Fig. 4). The difference between the two groups was already evolving towards significance at min 2 ($p < 0.10$). There was no difference between the total number of squares entered during min 1 and 5 of the test. Nevertheless, the analysis of variance exhibited a different

distribution within the two groups of animals at min 5, showing the wide heterogeneity of the PhB-exposed group as compared to controls ($F=3.44$, $p < 0.025$).

Spontaneous alternation

There was no significant difference in the number of control and PhB-treated rats reaching at least one of the goal arms of the T maze within 5 min, except on the first day with delay, where there was a 33 % reduction in the number of PhB-treated rats able to reach the time criterion as compared to controls ($p < 0.01$) (data not shown). Within the total number of control and PhB-treated rats which were examined in the spontaneous alternation test with or without delay, only those which reached the goal arms of the T maze within 5 min on each of the 5 test days were considered for the reminding part of the study. So, 26 saline- and 19 PhB-treated rats could be kept for the final analysis in the procedure without delay and 27 controls and 14 barbiturate-exposed rats were taken into account in the procedure with delay, among 28 animals in each group at the beginning of the study.

As shown in Table III, in the spontaneous alternation test without delay, the mean percentage of alternation on the 5 days test was the same whether the rats had been treated by PhB or saline. However, there was a 25 % reduction in the percentage of alternation in PhB-treated rats as compared to controls ($p < 0.05$), as soon as a delay was introduced between the two trials of the test.

As shown in Fig. 5, the time necessary to the rats considered in the study to reach anyone of the two goal arms of the T maze was higher in PhB-treated than in control animals. In the spontaneous alternation procedure without delay, this difference was significant ($p < 0.01$) on days 1, 2 and 4 for the first trial and on days 4 and 5 for the second trial. In the delayed spontaneous alternation test, this difference between control and PhB-treated rats reached significance in all cases except on day 2 for the second trial.

Eight arm maze performances

Among the 16 saline- and 16 PhB-treated rats, 2 animals in each group were not able to reach the time criterion of the test, i.e. entering 8 different arms within 15 min and were not considered any longer for the study. Over the 5 days of free choice testing, all the animals (14 saline- and 14 PhB-treated rats) were consistently choosing an average of 6 or more different arms within the first eight choices. There was no statistically significant difference in the number of correct responses in the first eight attempts as well as in the number of errors performed by saline- or PhB-treated rats (data not shown).

As far as time performances were concerned, there was no significant difference in the total time spent by either saline- or PhB-treated rats to visit the eight different arms of tne maze on any day. The first entry latency time was increased in PhB-exposed rats as compared to controls on day 2 and the first error latency time was reduced in the barbiturate-treated rats on days 4 and 5 (Fig. 6).

DISCUSSION

In the present study, the group of PhB-treated rats was only compared with saline-treated animals and not with a no injection control group. It is well known that the daily injection and handling of the animals may by themselves affect brain metabolism as a result of the release of glucosteroids, minerosteroids and the adrenal medulla secretion. However, we compared the levels of LCGU recorded in the saline-treated rats of the present study with those of our preceding work on no injection controls (22, 23). There was no significant difference in the rates of LCGU between these two groups of animals. For this reason, we compared the PhB-treated rats with saline-treated animals, to expose the two groups of rats to the same stress and handling, both for metabolic and behavioral studies.

On one hand, the chronic barbiturate treatment induces marked depressions in LCGU at all stages studied, except at P17. On the other hand, this pharmacological exposure completely modifies the pattern of cerebral maturation as compared to control subjects. So, in saline-treated rats, levels of LCGU significantly increase in most structures between P17 and P21, as shown in our previous studies (22, 23). In PhB-treated rats, values of LCGU rather increase between P14 and P17 to reach at that latter stage levels close to those of controls and again increase between P21 and P35 (Figs. 1-3). This effect of PhB can be noticed in cerebral structures belonging to different systems, sensory, motor, limbic, hypothalamic and white matter areas (29).

Spontaneous alternation is the tendency found in mature animals to enter opposite goal arms during two successive non-rewarded explorations in a T maze. This behavior is well known to be related to the hippocampus (6,7). Indeed, after large lesions of that cerebral structure, spontaneous alternation is reduced to chance values (7,12,34). The degree of impairment in spontaneous alternation following a chronic barbiturate treatment varies according to the period of exposure to the drug as well as to the species considered. Indeed, McBride et al. (18) showed that after an early postnatal PhB exposure, the performances of experimental and control adult rats in a water T maze are similar, whereas prenatal barbiturate treatment in the rat is able to induce deficits in T maze performance and in various learning situations, even higher when the drug is administered in the early period of pregnancy (1,19,21). Conversely, in the mouse, a neonatal PhB treatment induces more deficits in spontaneous alternation scores than a prenatal treatment. This difference is attributed to the more extensive cellular damage in the hippocampus of the mouse after a neonatal treatment (32,40). Conversely, in the rat, no extensive studies on cellular deficits after an early chronic barbiturate treatment have been achieved, at least not at the level of the hippocampus. Hannah et al. (10,11) only observed the presence of cellular destructions at the level of cerebellar Purkinje cells after an early PhB exposure.

In the present study, spontaneous alternation performances are only reduced in PhB- as compared to saline-treated rats when a delay is introduced between both trials of the test (Table III). Similar results have previously been obtained in rats with limited hippocampal lesions. Indeed, rats suffering hippocampal damage perform spontaneous alternation as well as normal rats when treated and tested with minimal intertrial delay whereas they alternate at chance levels after introduction of a delay between both trials (13,14). This deficit

appears to be rather due to loss of memory functions (13). The results of the present study also show that the early PhB treatment is able to induce long-term overall decreases in adult rats LCGU at the level of the ventral and dorsal hippocampus and in the dentate gyrus (Fig. 2). However, no significant differences in the levels of energy metabolism were found in the different cellular layers of hippocampus and cerebellum of adult rats previously exposed to the barbiturate. LCGU was only decreased in the pyramidal cell layer of the CA3 hippocampal regions in PhB- as compared to saline-treated rats with a trend towards significance ($P < 0.10$). These cells have been shown to be particularly sensitive to PhB in the mouse (39-43). However, it appears hard to correlate the levels of energy metabolism in the different cell layers of the hippocampus to cellular damage since the levels of LCGU are similar in cerebellar cell layers, at which level cellular destructions have been shown in the rat after an early PhB treatment (10,11).

Nevertheless, it has to be taken into account that in the present study, the spontaneous alternation performances were only analyzed on rats which were able to perform each trial within a maximal time of 5 min over the 5 consecutive days of the test. According to that limitation, 93 and 96 % of the control rats were considered for the study of spontaneous alternation without delay or with a 30 s intertrial delay respectively, whereas only 68 and 50 % of the PhB-treated rats could be kept for the final analysis in the same groups respectively. It also appears that PhB-treated rats needed more time than control animals to complete their trials, whether the spontaneous alternation was given with or without delay (Fig. 5). For 32 and 50 % of the total number of experimental rats not taken into account in the final analysis of the present study, the tendency to increase their time response was so high that these rats were not able to complete their trials within 5 min. These animals had a very hesitating behavior, seeming unable to react in their novel environment or to decide whether they should or not move. This tendency was also obvious in the open field behavior of PhB-treated animals. Indeed, in the present study, as in previous studies on rats and mice (4,5,9,20), there was a decrease in the exploratory behavior of PhB-treated rats as compared to controls (Fig. 4), but only at specific periods of the test. The lack of difference in the overall analysis of spontaneous activity in the open field between saline- and PhB-treated rats may be partly due to the wide heterogeneity of behavior noticed in the group of barbiturate-exposed animals. Indeed, some of them had a behavior and a spontaneous activity similar to controls, whereas other ones exhibited a very hesitating behavior, translating in almost no activity over the 5 min test period. This wide heterogeneity of behavior is confirmed by the significant difference in the variances of open field activity data during min 5 (Fig. 4). These behavioral differences after an early PhB exposure have also been noticed in children, some of them showing marked behavioral and learning capacities deficits, whereas other ones were perfectly comparable to children not exposed to drugs (2,3). This great variability in the ability of barbiturate-exposed animals to complete their behavioral tasks may originate in a difference to the sensitivity to PhB. It then appears that learning abilities of these PhB-treated rats in quite simple tests are not impaired, since they are able to alternate as well as control rats, even if they need significantly more time to perform their trials. However, when testing starts to be more difficult, i.e. when a delay is introduced in spontaneous alternation procedure, some behavioral deficits appear, as

previously shown in animals with limited hippocampal damage (13,14). Likewise, Pick and Yanai (32), who showed cellular destructions in the hippocampus of the mice (39-43), also found higher deficits in spontaneous alternation performance of PhB-treated mice as soon as a delay was introduced in the test. These results are confirmed by long-term reductions in eight arm maze performance among mice, whether the barbiturate exposure was prenatal or neonatal (33).

Spontaneous alternation behavior is well known to be related to the hippocampus (6,7). The eight arm maze behavior, which is a more sophisticated test than spontaneous alternation behavior also contains a spontaneous alternation component (27) and appears to be well correlated to electrical activity in the hippocampus (26). Indeed, animals with hippocampal damage have been shown to perform this behavioral task less efficiently than intact controls (25,27). Also, Pick and Yanai (33) observed deficits in this test in mice treated with the barbiturate either prenatally or postnatally. However, a neonatal exposure to PhB from day 2 to 35 does not seem to impair notably eight arm maze performance in the adult rat. The interspecies difference in the long-term behavioral effects of PhB between rat and mouse, especially in eight arm maze behavior, might arise in a different sensitivity of hippocampal cells to an early PhB treatment in both animal species. In addition, whereas the rate of spontaneous alternation in a procedure introducing a delay between both trials was decreased in PhB- as compared to saline-treated rats, no major behavioral disturbances seem to exist in the eight arm maze behavior between both groups of rats. But, in the eight arm maze behavior, prior to testing, the animals are food restricted and get a reward each time they reach a correct goal arm. This motivation does not exist at all in the non-rewarded T maze testing. So, getting a food reward is likely to be a good stimulation for PhB-treated animals, which have been shown to exhibit a very hesitating behavior in the T maze.

In conclusion, the present study shows that an early chronic PhB treatment is able to induce long-term behavioral disturbances, especially translating into a slowing down in the ability to perform a behavioral task and into an impairment in delayed spontaneous alternation. However, in a learning test with a reward, such as the eight arm maze, the pharmacological treatment does not seem to have any incidence on animals performances. It is also obvious that the consequences of this barbiturate treatment on adult behavior reach very variable levels of severity, according to the individuals considered. However, it seems very hard to correlate the behavioral deficits recorded in the present study to the rates of cerebral energy metabolism, especially at the level of the hippocampal cell layers.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to express their gratitude to Pr P. Vert, Director of INSERM U 272, and to Pr B. Krafft, Director of CNRS UA 233 for their constant support, encouragement and advice. This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U272) and from the Fondation pour la Recherche Médicale (Comité Lorraine). The authors are very grateful to Dr R. Chermat (Société CATPAL, St-Berthevin, France) for helpfull discussion. The authors wish to thank P. Michel for animals pharmacological treatment, S. Boyet and P. Michel for excellent technical assistance.

REFERENCES

1. ARMITAGE, S.G. 1952. The effects of barbiturates on the behavior of rat offspring as measured in learning and reasoning situations. J. Comp. Physiol. Psychol. **45** : 146-152.
2. BEHRMAN, R.E., AND V.C. VAUGHAN. 1987. Nelson Textbook of Pediatrics, 13th ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia.
3. DE AJURIAGUERRA, J., AND D. MARCELLI. 1982. Psychopathologie de l'Enfant, Masson, Paris.
4. DIAZ, J., AND R.J. SCHAIN. 1977. Chronic phenobarbital administration : effects upon brain growth and behavior of artificially reared rats. Proc. West. Pharmacol. Soc. **20** : 153-157.
5. DIAZ, J., AND R.J. SCHAIN. 1978. Phenobarbital : Effects of long term administration on behavior and brain of artificially reared rats. Science **199** : 90-91.
6. DOUGLAS, R.J. 1966. Transposition novelty and limbic lesions. J. Comp. Psychol. **62** : 354-357.
7. DOUGLAS, R.J. 1975. The development of hippocampal function. Pages 327-361 in R.L. Isaacson and K.H. Puibran, Eds., The Hippocampus, Vol 2. Plenum Press, New York.
8. EAYRS, J.T. 1955. The cerebral cortex of normal and hypothyroid rats. Acta Anat (Basel) **25** : 160-183.
9. FONSECA, N.M., A.B. SELL, AND E.A. CARLINI. 1976. Differential behavioral responses of male and female adult rats treated with five psychotropic drugs in the neonatal stage. Psychopharmacologia **6** : 263-268.
10. HANNAH, R.S., S.H. ROTH, AND A.W. SPIRA. 1982. The effect of chlorpromazine and phenobarbital on cerebellar Purkinje cells. Teratology **26** : 21-25.
11. HANNAH, R.S., S.H. ROTH, AND A.W. SPIRA. 1988. Effect of phenobarbital on Purkinje cell growth patterns in the rat cerebellum. Exp. Neurol. **100** : 354-364.
12. ISAACSON, R.L. 1974. The Limbic System, Plenum Prees, New York.
13. ISSEROFF, A. 1979. Limited recovery of spontaneous alternation after extensive hippocampal damage : evidence for a memory impairment. Exp. Neurol. **64** : 284-294.
14. ISSEROFF, A. 1980. Facilitation of delayed spontaneous alternation behavior in adult rats following early hydroxyzine treatment : differential sensitivity in late infancy. Psychopharmacology **69** : 179-181.
15. JOLLEY, M.E., S.D. STROUPE, K.S. SCHWENZER, C.J. WANG, M. LU-STEFFES, H.D. HILL, S.R. POPELKA, J.T. HOLEN, AND D.M. KELSO. 1981. Fluorescence polarization immunoassay. III. An automated system. Clin. Chem. **27** : 1575-1579.
16. KIRK, R.E. 1968. Experimental Design: Procedures for the Behavioral Sciences, Brooks/Cole, Belmont, CA.
17. LU-STEFFES, M., G.W. PITTLUCK, M.E. JOLLEY, H.N. PANAS, D.N. OLIVE, C.H. WANG, D.D. NYSTROM, C.L. KLEGAN, T.P. DAVIS, AND S.D. STROUPE. 1982. Fluorescence polarization immunoassay. IV. Determination of phenytoin and phenobarbital in human serum and plasma. Clin. Med. **28** : 2278-2282.
18. MCBRIDE, M.C., N.P. ROSMAN, S.J. DAVIDSON, AND E.Y. OPPENHEIMER. 1985. Long-term behavioral effects of phenobarbital in suckling rats. Exp. Neurol. **89** : 59-70.

19. MIDDAUGH, L.D., C.A. SANTOS III, AND J.W. ZEMP. 1975. Effects of phenobarbital given to pregnant mice on behavior of mature offspring. Develop. Psychobiol. **8** : 305-313.
20. MIDDAUGH, L.D., L.W. SIMPSON, T.N. THOMAS, AND J.W. ZEMP. 1981. Prenatal maternal phenobarbital increases reactivity and retards habituation of mature offspring to environmental stimuli. Psychopharmacology **74** : 349-352.
21. MURAI, N. 1966. Effect of maternal medication during pregnancy upon behavioral development of offspring. Tohoku J. Exp. Med. **89** : 265-272.
22. NEHLIG, A., A. PEREIRA DE VASCONCELOS, AND S. BOYET. 1988. Quantitative autoradiographic measurement of local cerebral glucose utilization in freely moving rats during postnatal development J. Neurosci. **8** : 2321-2333.
23. NEHLIG, A., A. PEREIRA DE VASCONCELOS, AND S. BOYET. 1988. Evolution postnatale de l'utilisation cérébrale locale de glucose chez le rat : étude quantitative. Circ. Metabol. Cerveau **5** : 72-87.
24. NEHLIG A., A. PEREIRA DE VASCONCELOS, P. VERT. 1989. Effects of phenobarbital on energy metabolism in the developing brain. In C. Wasterlain, P. Vert, Eds. Neonatal seizures : Physiopathology and pharmacological Manadgement. Raven Press, New York, in press.
25. OLTON, D.S. 1979. The function of septo-hippocampal connections in spatially organized behavior. Pages 327-349 in Ciba foundation Symposium 58, Functions of the Septo-Hippocampal System. Elsevier, New York.
26. OLTON, D.S., M. BRANCH, AND P.J. BEST. 1978. Spatial correlates of hippocampal unit activity. Exp. Neurol. **58** : 387-409.
27. OLTON, D.S., AND R.J. SAMUELSON. 1976. Rememberance of places passed. Spatial memory in rats. J. Exp. Psychol. Animal Behav. Processes **2** : 97-116.
28. PAXINOS, G., AND C. WATSON. 1982. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press, New York.
29. PEREIRA DE VASCONCELOS, A., S. BOYET, AND A. NEHLIG. 1990. Consequences of chronic phenobarbital treatment on local cerebral glucose utilization in the developing rat. Develop. Brain Res., in press.
30. PEREIRA DE VASCONCELOS, A., AND A. NEHLIG. 1987. Effects of early phenobarbital treatment on the maturation of energy metabolism in the developing rat brain. I Incorporation of glucose carbon into amino acids. Develop. Brain Res. **36** : 219-229.
31. PEREIRA DE VASCONCELOS, A., H. SCHROEDER, AND A. NEHLIG. 1987. Effects of early chronic phenobarbital treatment on the maturation of energy metabolism in the developing rat brain. II Incorporation of ß-hydroxybutyrate into amino acids. Develop. Brain Res. **36** : 231-236.
32. PICK, C.G., AND J. YANAI. 1984. Long term reduction in spontaneous alternations after early exposure to phenobarbital. Int. J. Develop. Neurosci. **2** : 223-228.
33. PICK, C.G., AND J. YANAI. 1985. Long term reduction in eight arm maze performance after early exposure to phenobarbital. Int. J. Develop. Neurosci. **3** : 223-227.
34. ROBERTS, W.W., W.N. DEMBER, AND M. BRODERICK. Alternation and exploration in rats with hippocampal lesions. J. Comp. Physiol. Psychol. 55 : 695-700.

35. SCHAIN, R.J., AND K. WATANABE. 1975. Effects of chronic phenobarbital administration upon brain growth in the infant rat. Exp. Neurol. **47** : 509-515.
36. SHERWOOD, N.M., AND P.S. TIMIRAS 1970. A Stereotaxic Atlas of the Developing Rrat Brain, University of California Press, Berkeley.
37. SIEGEL, S. 1956. Non-Parametric Statistics for the Behavioral Sciences. McGraw-Hill, New York.
38. SOKOLOFF, L., M. REIVICH, C. KENNEDY, M.H. DESROSIERS, C.S. PATLAK, K.D. PETTIGREW, O. SAKURADA, AND M. SHINOHARA. 1977. The [^{14}C]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.
39. YANAI, J. 1984. An animal model for the effects of barbiturate on the developement of the central nervous system. Pages 111-132 in J. Yanai Ed., Neurobehavioral Teratology. Elsevier, Amsterdam.
40. YANAI, J., AND A. BERGMAN. 1981. Neuronal deficits in mice following neonatal exposure to barbiturates. Exp. Neurol. **73** : 199-208.
41. YANAI, J., A. BERGMAN, R. SHAFER, G. YEDWAB, AND B. TABAKOFF. 1981. Audiogenic seizures and neuronal deficits following early exposure to barbiturate. Dev. Neurosci. **4** : 345-350.
42. YANAI, J., AND C. ISER. 1981. Dendritic deficits in the Purkinje cells following early exposure to phenobarbital. Exp. Neurol. **74** : 707-716.
43. YANAI, J., L. ROSSELLI-AUSTIN, AND B. TABAKOFF. 1979. Neuronal deficits in mice following prenatal exposure to phenobarbital. Exp. Neurol. **65** : 237-244.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1 : Effects of chronic PhB treatment on postnatal evolution of whole brain weighted average glucose utilization.
○ $p < 0.05$, ○○ $p < 0.01$, statistically significant difference from one developmental stage to the preceding stage in the saline-treated rats ;
● $p < 0.05$, ●● $p < 0.01$, statistically significant difference from one developmental stage to the preceding stage in the PhB-treated rats (Bonferroni's t-test).
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, statistically significant differences from controls (Student's t-test).

Figure 2 : Effects of chronic PhB treatment on postnatal evolution of LCGU in hippocampal areas.
○ $p < 0.05$, ○○ $p < 0.01$, statistically significant difference from one developmental stage to the preceding stage in the saline-treated rats ;
● $p < 0.05$, ●● $p < 0.01$, statistically significant difference from one developmental stage to the preceding stage in the PhB-treated rats (Bonferroni's t-test).
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, statistically significant differences from controls (Student's t-test).
Abreviation : Ad : adult ; DHIP : dorsal hippocampus ; VHIP : ventral hippocampus ; DGYR : dentate gyrus.

Figure 3 : Effects of chronic PhB treatment on postnatal evolution of LCGU in cerebellar structures.
○ $p < 0.05$, ○○ $p < 0.01$, statistically significant difference from one developmental stage to the preceding stage in the saline-treated rats ;
● $p < 0.05$, ●● $p < 0.01$, statistically significant difference from one developmental stage to the preceding stage in the PhB-treated rats (Bonferroni's t-test).
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, statistically significant differences from controls (Student's t-test).
Abreviation : Ad : adult ; CBCX : cerebellar cortex ; DENT : dentate nucleus ; INT : interpositus nucleus ; FAST : fastigial nucleus.

Figure 4 : Effects of postnatal PhB treatment on open field behavior. The rats received a daily subcutaneous injection of PhB from day 2 to 35 at a dose of 50 mg/kg and were tested at 80 days. The diagrams represent medians, superior and inferior quartiles as well as the lowest and highest value of the total number of squares entered by 11 control and 14 PhB-treated rats during each minute of the 5 min open field testing.
* $p < 0.05$, ** $p < 0.002$, statistically significant difference from control (Mann-Whitney U-test).

Figure 5 : Effects of postnatal PhB treatment on the time necessary to reach one of the goal arms of the T maze. The rats received a daily subcutaneous injection of PhB from day 2 to 35 at a dose of 50 mg/kg and were tested at 70 days. The graphs represent medians of 26 control and 19 PhB-treated rats in no delay condition and of 27 control and 14 PhB-treated rats in delay (30 s) condition.
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, statistically significant differences from controls (Mann-Whitney U-test).

Figure 6 : Effects of postnatal PhB treatment on eight arm maze behavior of 16 controls and 16 PhB-treated rats. The animals received a daily subcutaneous injection of PhB from day 2 to 35 at the dose of 50 mg/kg and were tested at 90 days. The graphs represent medians of the total time, the first entry latency time and the first error latency time on each of the five days of testing in the eight arm maze.
* $p < 0.05$, statistically significant difference from control

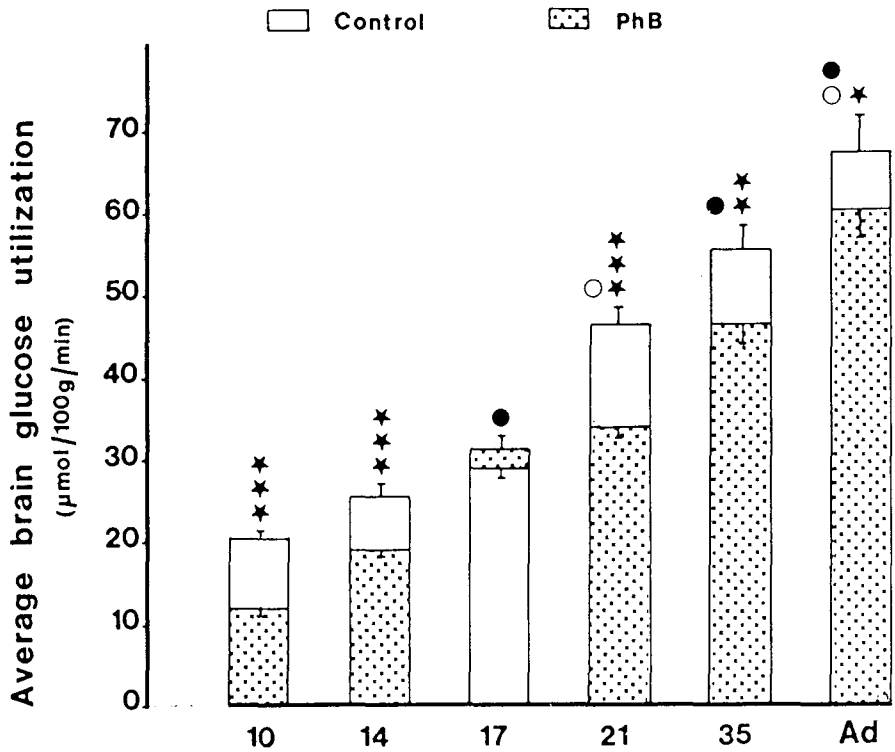

Control
PhB
Average brain glucose utilization
(µmol/100g/min)
0
10
20
30
40
50
60
70
10
14
17
21
35
Ad

Figure 1.

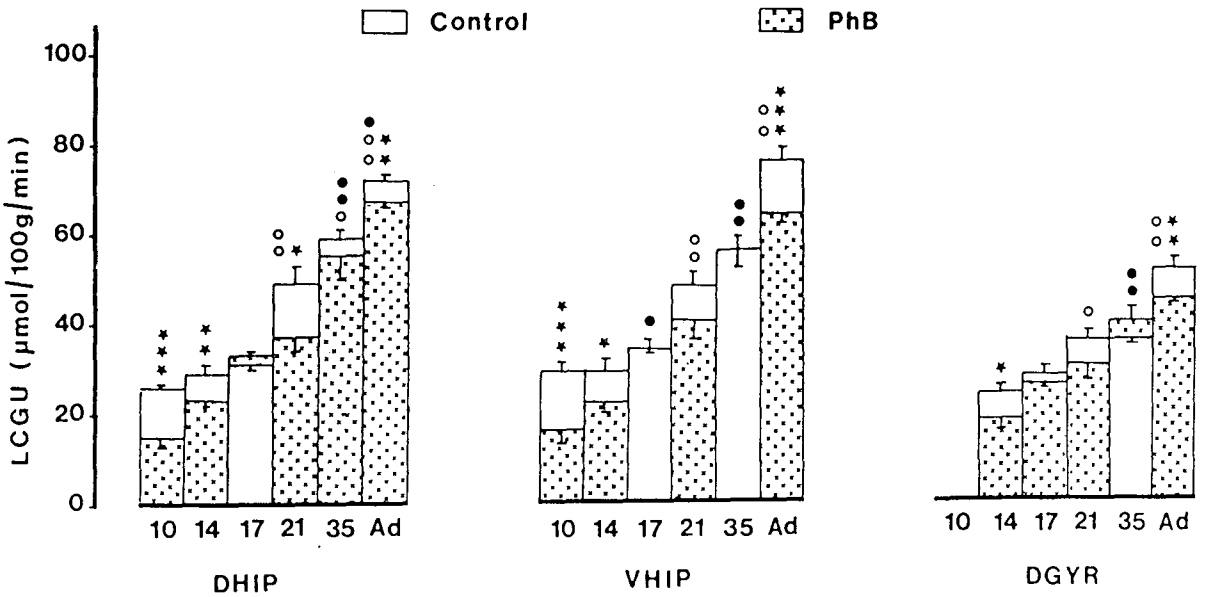

Control
PhB
LCGU (µmol/100g/min)
100
80
60
40
20
0
10 14 17 21 35 Ad
DHIP
10 14 17 21 35 Ad
VHIP
10 14 17 21 35 Ad
DGYR

Figure 2.

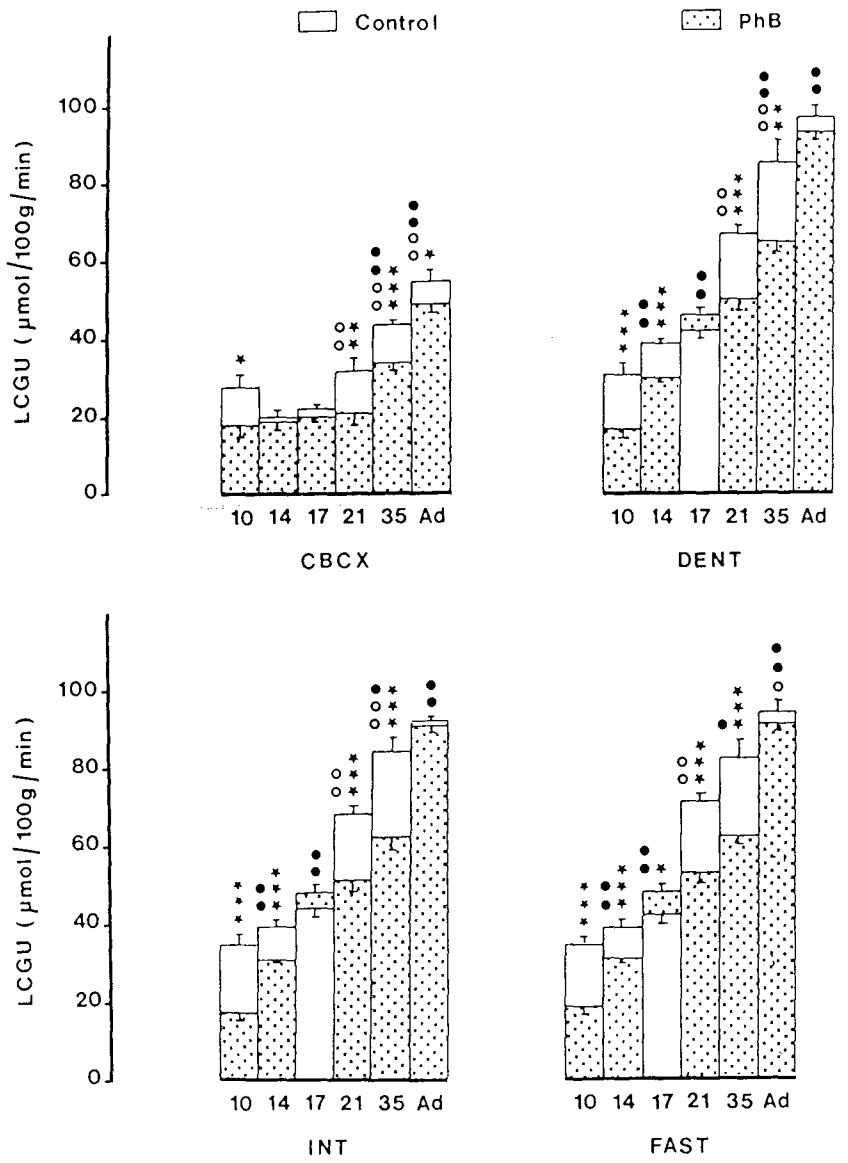

Control
PhB
LCGU (µmol/100g/min)
100
80
60
40
20
0
10 14 17 21 35 Ad
CBCX
DENT
INT
FAST

Figure 3.

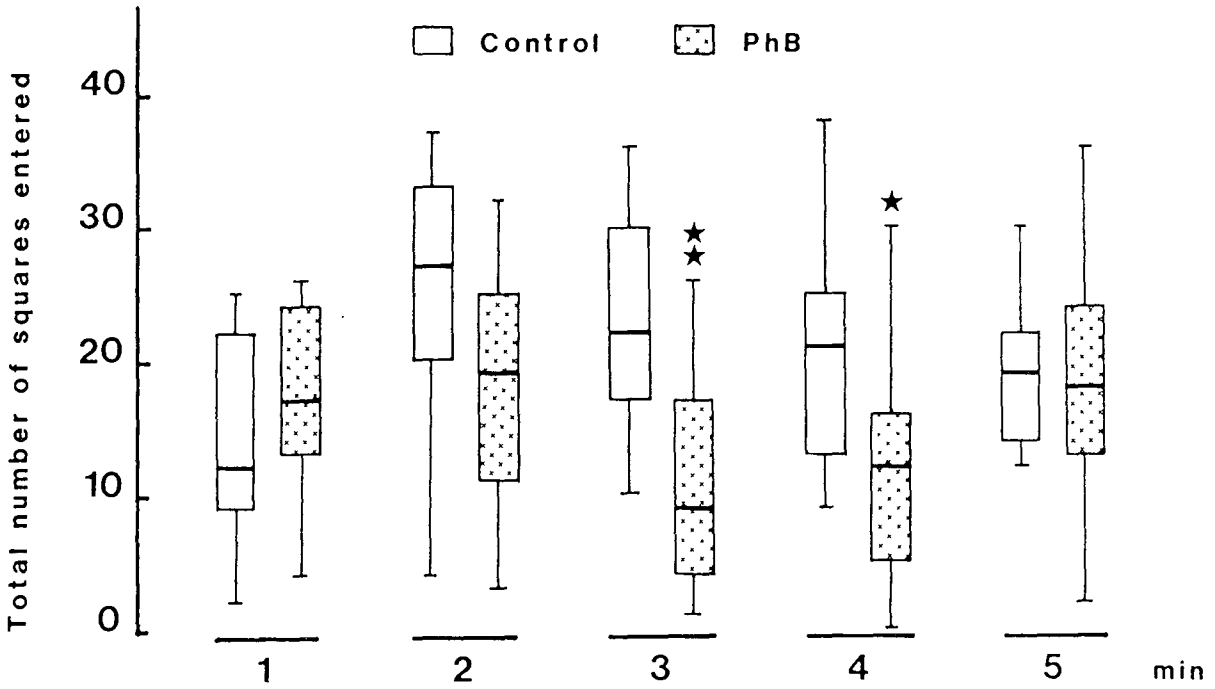

Control
PhB
Total number of squares entered
40
30
20
10
0
1
2
3
4
5
min

Figure 4.

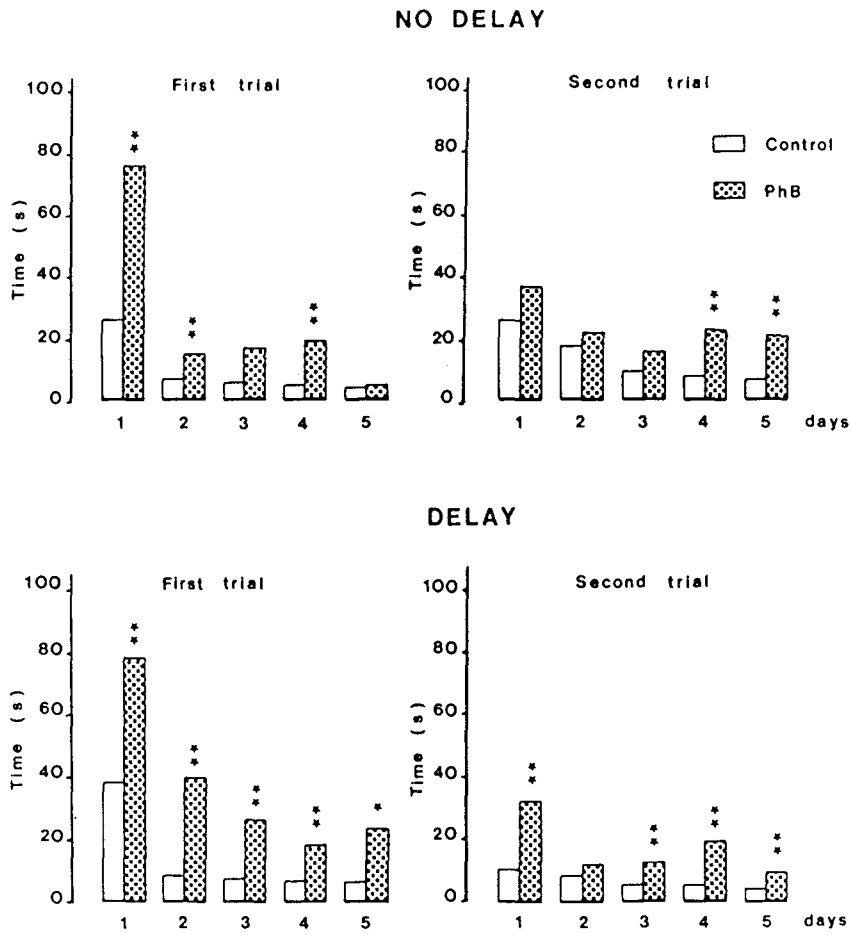

NO DELAY
First trial
Second trial
Control
PhB
Time (s)
100
80
60
40
20
0
1
2
3
4
5
days
DELAY
First trial
Second trial
Time (s)
100
80
60
40
20
0
1
2
3
4
5
days

Figure 5

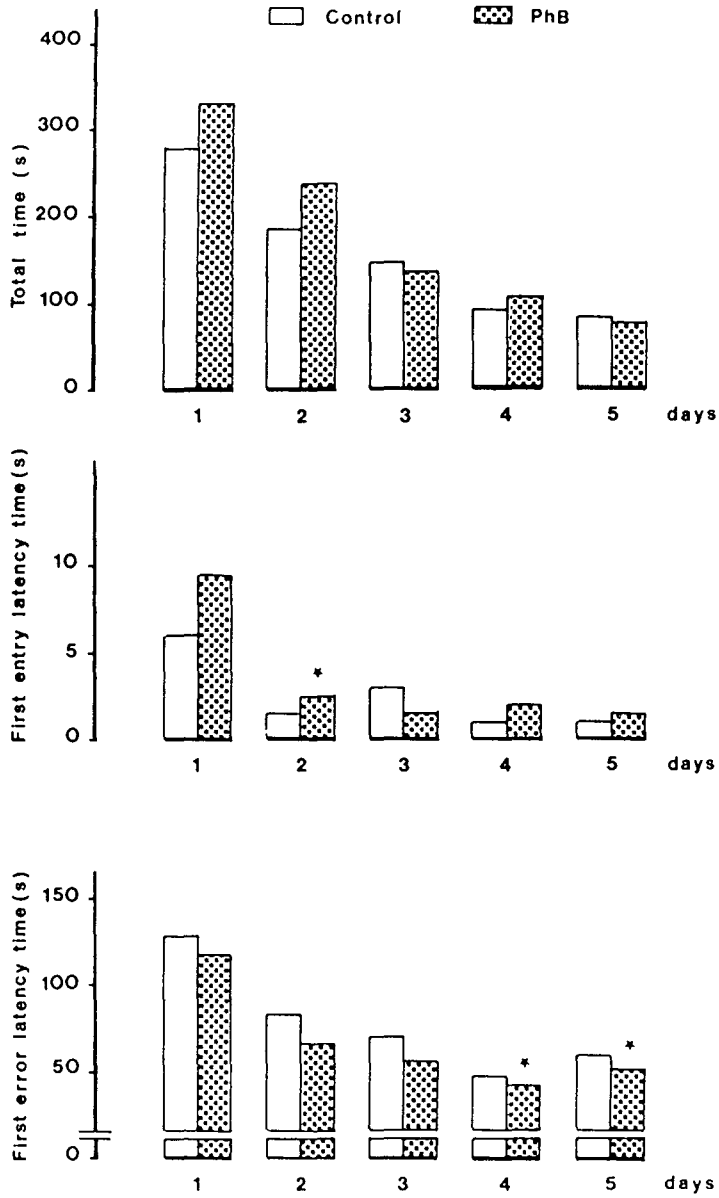

Control
PhB
Total time (s)
400
300
200
100
0
1
2
3
4
5
days
First entry latency time(s)
10
5
0
*
First error latency time(s)
150
100
50
0
*
*

Figure 6.

TABLE I : EFFECTS OF PHENOBARBITAL ON PHYSIOLOGICAL VARIABLES OF DEVELOPING RATS.
Values are means + S.E.M. of the number of animals in parentheses, except for brain weight and plasma PhB levels which are means + S.E.M. of 5 to 22 animals.

		P10 (n=5)	P14 (n=5)	P17 (n=5)	P21 (n=5)	P35 (n=5)	Adult (n=5)
Body weight (g)	C	24 ± 1	33 ± 2	42 ± 2	49 ± 1	141 ± 5**	422 ± 6**
	PhB	21 ± 1[b]	30 ± 1[a]	38 ± 1[a]	46 ± 1[a]	112 ± 8**[b]	399 ± 8**[a]
Brain weight (g)	C	0.96±0.01	1.22±0.01**	1.31±0.02*	1.44±0.02*	1.71±0.01**	2.11±0.02**
	PhB	0.86±0.01[b]	1.14±0.01**[b]	1.21±0.02*[b]	1.33±0.02*[b]	1.60±0.02**[b]	2.01±0.03**[b]
Plasma glucose concentration (mg/100 ml)	C	127 ± 2	141 ± 6	148 ± 3	131 ± 3	155 ± 8*	155 ± 8
	PhB	96 ± 5[d]	128 ± 5**[a]	147 ± 6*	129 ± 3	140 ± 5	166 ± 5*
Plasma PhB concentration (ug/ml)	PhB	70 ± 3	80 ± 3*	71 ± 8*	53 ± 2**	41 ± 2**	---
Arterial blood pressure (mmHg)	C	50 ± 3	54 ± 2	67 ± 2**	79 ± 2**	102 ± 2**	124 ± 2**
	PhB	51 ± 2	54 ± 1	70 ± 3**	77 ± 3	106 ± 2**	129 ± 2**
Hematocrit (%)	C	31 ± 1	29 ± 1	24 ± 1**	34 ± 1**	40 ± 1**	46 ± 1**
	PhB	29 ± 2	23 ± 1[b]	27 ± 1[a]	26 ± 1[d]	35 ± 2**[a]	43 ± 1**[a]
Arterial pH	C	7.48±0.02	7.43±0.02	7.48±0.02	7.51±0.01	7.49±0.01	7.43±0.03
	PhB	7.44±0.01	7.47±0.02	7.48±0.01	7.51±0.01	7.48±0.01	7.46±0.02
Arterial pO_2 (mmHg)	C	86 ± 2	86 ± 2	91 ± 1	87 ± 1	86 ± 3	81 ± 2
	PhB	82 ± 3	82 ± 2	64 ± 2**	86 ± 2**	76 ± 5	82 ± 3
Arterial pCO_2 (mmHg)	C	28 ± 2	35 ± 2*	33 ± 2	30 ± 2	35 ± 1	34 ± 1
	PhB	36 ± 2[a]	38 ± 1	37 ± 1	30 ± 1*	37 ± 1*	36 ± 2

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, statistically significant differences from one developmental stage to the preceding one.
a $p < 0.05$, b $p < 0.01$, d $p < 0.0005$, statistically significant differences between controls (C) and PhB-treated rats at a given stage.

TABLE II : LONG-TERM EFFECTS OF PHENOBARBITAL ON LOCAL CEREBRAL GLUCOSE UTILIZATION IN THE DIFFERENT CELLULAR LAYERS OF HIPPOCAMPUS AND CEREBELLUM OF ADULT RATS. Values are means ± S.E.M. of the number of animals in parentheses, expressed as umol/100 g/min.

	Control (n=6)	Phenobarbital (n=6)
Hippocampus		
CA1 area		
Stratum oriens	58 ± 2	58 ± 1
Pyramidal cell layer	70 ± 3	68 ± 1
Stratum radiatum	66 ± 2	63 ± 1
CA3 area		
Stratum oriens	58 ± 2	56 ± 1
Pyramidal cell layer	74 ± 3	69 ± 1
Stratum radiatum	69 ± 3	68 ± 1
Lacunosum molecular layer	88 ± 3	88 ± 2
Dentate gyrus		
Molecular layer	54 ± 1	57 ± 1
Granular layer	48 ± 1	51 ± 2
Cerebellum		
Molecular layer	59 ± 3	61 ± 2
Granular layer	63 ± 3	63 ± 2
White matter	38 ± 2	41 ± 1*

* $p < 0.05$, statistically significant difference between controls and PhB-treated rats.

Table III: Effect of early PhB treatment upon adult spontaneous alternation perfomances in no delay and delay conditions.

	No delay	Delay
Control	67.6 ± 4.4 (26)	60.8 ± 4.0 (27)
PhB	60.0 ± 6.4 (19)	45.8 ± 7.6* (14)

The results represent mean percent alternation ± S.D. over the five days. The number of animals is indicated in parentheses.
*$P < 0.05$, statistically significant difference from controls (Student's t-test).

MEMOIRE F

Effets à court et à long terme d'un traitement chronique précoce au phénobarbital sur la maturation du métabolisme énergétique cérébral et sur le comportement

A. Pereira de Vasconcelos*, C. Colin**, S. Boyet* et A. Nehlig*

** INSERM U 272 université de Nancy-I, 30, rue Lionnois, BP 3137, 54013 Nancy Cedex*
*** CNRS UA 233 université de Nancy-I, boulevard des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandœuvre Cedex*

Résumé. L'influence du phénobarbital (PhB) sur l'évolution postnatale de divers aspects du métabolisme énergétique cérébral et sur le comportement a été étudiée chez le rat. Les animaux ont été traités du 2e au 35e jour de la vie postnatale par une administration sous-cutanée de PhB à la dose de 50 mg/kg/j ou par du sérum physiologique. Les animaux ont été étudiés à 7, 10, 14, 17, 21, 35 jours et au stade adulte. Le traitement au PhB induit une diminution du poids corporel et cérébral à tous les stades étudiés. Les concentrations circulantes de glucose sont diminuées alors que celles des composés cétoniques sont augmentés par le PhB. De plus, l'exposition au barbiturique diminue l'incorporation du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux alors que le β–hydroxybutyrate est un précurseur plus actif de la biosynthèse de ces mêmes acides aminés chez les rats traités au PhB que chez les témoins. L'utilisation cérébrale locale de glucose mesurée par autoradiographie quantitative est diminuée chez les animaux exposés au barbiturique par rapport aux témoins non seulement au cours du traitement, soit jusqu'à 35 jours, mais également à long terme chez l'animal adulte. Ces dépressions à long terme du métabolisme énergétique cérébral s'accompagnent de perturbations du comportement chez l'animal adulte. Ainsi, le pourcentage d'alternance spontanée est réduit chez les animaux traités au PhB qui de plus sont beaucoup plus lents que les témoins pour réaliser leurs essais d'alternance. Par contre, dans un labyrinthe à 8 branches, les perturbations des capacités d'apprentissage des rats traités au PhB disparaissent après les deux premiers jours de test.

Mots Clés : Métabolisme énergétique cérébral; glucose; β–hydroxybutyrate; phénobarbital; traitement chronique; 2-désoxyglucose-^{14}C; développement postnatal; comportement; rat.

Manuscrit reçu le 19 mai 1989
Travail présenté au Symposium international -Tomographie et autoradiographie du cerveau : applications en physiopathologie et en thérapeutique, Bruxelles, les 21 et 22 avril 1989.

Introduction

Le phénobarbital (PhB) est un agent anticonvulsivant couramment utilisé en clinique, en particulier en néonatologie, dans le traitement et la prévention des crises convulsives. Une exposition chronique précoce du PhB chez le rat ou la souris induit une diminution du poids corporel et cérébral (Diaz et Schain, 1977; Pereira de Vasconcelos et Nehlig, 1987a; Schain et Watanabe, 1975; Yanai et Bergman, 1981; Yanai *et al.*, 1979). Le retard de croissance cérébrale s'accompagne de destructions cellulaires, en particulier au niveau des cellules de Purkinje du cervelet et des cellules pyramidales de l'hippocampe. Ces dommages cellulaires apparaissent aussi bien lorsque les mères sont traitées par le barbiturique au cours de la gestation que lorsque les animaux sont traités après la naissance, montrant ainsi que le PhB est capable de détruire aussi bien des cellules en phase de prolifération, migration et différentiation que des neurones déja formés (Hannah *et al.*, 1982, 1988; Yanai, 1984; Yanai et Bergman, 1981, Yanai et Iser, 1981; Yanai *et al.*, 1979, 1981).

Un traitement chronique précoce au PhB induit également une diminution des teneurs cérébrales en acides nucléiques, protéines et cholestérol (Diaz et Schain, 1977; Schain et Watanabe, 1975) et inhibe l'incorporation de la leucine dans les protéines de la myéline (Patsalos et Wiggins, 1982). De même, les taux de neurotransmetteurs sont affectés par une exposition précoce au barbiturique. Ainsi, un traitement prénatal au PhB chez la souris induit une diminution des taux cérébraux de dopamine et de noradrénaline et une augmentation de la capture de dopamine, noradrénaline, sérotonine et GABA par des préparations de synaptosomes du tissu cérébral (Middaugh *et al.*, 1981b).

Enfin, on a montré que l'administration précoce de PhB pouvait induire à long terme des modifications du comportement. Ainsi, on a pu noter des perturbations de l'activité locomotrice (Diaz et Schain, 1977; Middaugh *et al.*, 1975, 1981a) et des déficits des capacités d'apprentissage en labyrinthe (Armitage, 1952; Murai, 1966; Pick et Yanai, 1984, 1985) dont l'intensité varie en fonction de la dose administrée, de la période et de la durée du traitement.

Dans ce travail, nous avons examiné les effets d'un traitement chronique précoce au PhB sur le métabolisme énergétique du cerveau de rat en développement en étudiant, d'une part, la biosynthèse des acides aminés à partir du glucose et des composés cétoniques et, d'autre part, l'utilisation cérébrale locale de glucose mesurée à l'aide de la méthode autoradiographique quantitative au 2-désoxyglucose-^{14}C mise au point par Sokoloff *et al.* (1977) et adaptée au rat immature (Nehlig *et al.*, 1988a et b). En raison de l'importance des perturbations du métabolisme énergétique cérébral observées au cours de la période d'exposition au PhB et de leur persistance à long terme chez le rat adulte, nous avons également étudié les effets à long terme de ce traitement néonatal au PhB sur l'activité motrice et les capacités d'apprentissage du rat adulte en labyrinthe afin de déterminer si les perturbations à long terme du métabolisme énergétique cérébral pouvaient être accompagnées par des modifications du comportement. Pour ces études, les rats ont reçu une injection sous-cutanée de PhB à la dose de 50 mg/kg/j du 2e au 35e jour de vie postnatale et ont été étudiés à 7, 10, 14, 17, 21 et 35 jours ainsi qu'au stade adulte.

Matériels et méthodes

Etudes biochimiques

Animaux

Des rats Sprague-Dawley adultes, un mâle et deux femelles par cage, ont été mis en accouplement pendant 5 jours. Les animaux ont été maintenus dans des conditions standard avec une alternance du cycle jour/nuit de 12 heures (lumières allumées à 6 h 00). La nourriture et l'eau ont été disponibles à volonté. Après la naissance, les portées ont été réduites à 12 animaux. Le phénobarbital (sel de sodium de l'acide 5-éthyl-5-phénylbarbiturique, Fluka, Buchs, Suisse) dissous dans du sérum physiologique a été administré par voie sous-cutanée aux jeunes rats entre le 2e et le 35e jour après la naissance à la dose de 50 mg/kg/j. Les animaux témoins ont reçu le même volume de sérum physiologique. Pour les études au cours du développement, les expériences ont été réalisées environ 3 heures après l'administration quotidienne de PhB. Les expériences ont été réalisées à 7, 10, 14, 17, 21 et 35 jours ainsi qu'au stade adulte. Jusqu'à 21 jours, les animaux des deux sexes ont été utilisés; en revanche à 35 jours et au stade adulte, les expériences ont porté uniquement sur des rats mâles, pour éviter les variations du métabolisme cérébral liées à la cyclicité chez les femelles (Nehlig *et al.*, 1985).

Mesure des concentrations circulantes de glucose, β–hydroxybutyrate et acétoacétate

La concentration plasmatique de glucose a été déterminée à l'aide d'un analyseur Hitachi, modèle 705. Pour la mesure des concentrations circulantes de composés cétoniques, le sang a été recueilli dans des coupelles héparinées après décapitation des animaux, déprotéinisé à l'aide d'acide perchlorique 10% (V/V) glacé puis centrifugé à 3000 g pendant 15 min à +2°C. Le liquide surnageant, neutralisé à l'aide de KOH 20% a été utilisé pour la détermination spectrophotométrique d'acétoacétate (Mellanby et Williamson, 1974) et de β–hydroxybutyrate (Williamson et Mellanby, 1974) selon des techniques enzymatiques utilisant la β–hydroxybutyrate déshydrogénase à l'aide d'un spectrophotomètre Bausch et Lomb, modèle Spectronic 2000 (Bausch et Lomb, Analytical Systems Division, Rochester, USA).

Mesure de l'incorporation du carbone du glucose-2-^{14}C et du β–hydroxybutyrate-3-^{14}C dans les acides aminés cérébraux

Les animaux témoins et traités au PhB ont reçu une injection intrapéritonéale de 7 à 10 µCi/100 g de poids corporel de glucose-(2-^{14}C) ou de β–hydroxybutyrate-3-^{14}C (activité spécifique 45-55 mCi/mmol; New England Nuclear, Boston, USA). Trente minutes après l'administration du traceur, les animaux ont été sacrifiés soit par immersion dans l'azote liquide à 7, 10 et 14 jours, soit par décapitation et immersion immédiate de la tête dans l'azote liquide à 21 et 35 jours. Ensuite, les têtes des animaux ont été conservés à – 80°C.

Les cerveaux ont été disséqués en trois parties, le cortex cérébral, les structures sous-corticales et le cervelet dans une chambre froide à +2°C. Le tissu a été pesé puis homogénéisé dans l'acide perchlorique 6% (V/V) à l'aide d'un ultra-turrax selon la technique décrite précédemment (Pereira de Vasconcelos et Nehlig, 1987a). L'extrait acido-soluble cérébral a été déposé sur un colonne de résine échangeuse de cations (Amberlite IRN-77 sous forme H^+). Les acides aminés fixés sur la résine ont été élués à

l'aide de NH^4OH 3 N. L'effluent de la colonne a été réduit à sec dans un évaporateur rotatif sous vide à + 40°C. Le résidu sec a été dissous dans un volume connu d'isopropanol 10%. La radioactivité des différents acides aminés a été déterminée après séparation bi-dimensionnelle en chromatographie sur couche mince et comptée dans un compteur à scintillation liquide Beckman LS 1801 selon la technique décrite précédemment (Pereira de Vasconcelos et Nehlig, 1987a).

Mesure de l'utilisation cérébrale locale de glucose

La veille de l'expérience, une veine et une artère fémorales ont été cathétérisées sous anesthésie légère à l'halothane. Les deux cathéters ont été passés sous la peau et ressortis dans le dos au niveau du cou. Une boucle a été formée à l'extrémité de chaque cathéter qui ont ensuite été repoussés sous la peau qui a été recousue. Les animaux ont été remis dans leur environnement normal, avec la mère pour les rats en allaitement.

Le jour de l'expérience, les rats ont été transférés dans une boîte en plastique de taille variable selon le stade étudié. Ce dispositif permet l'accès aux cathéters et le libre déplacement de l'animal. Les fils au niveau de la peau du cou ont été sectionnés pour permettre de ressortir des cathéters. L'utilisation cérébrale locale de glucose a été mesurée à l'aide de la méthode autoradiographique quantitative au 2-désoxyglucose-^{14}C (2DG) décrite par Sokoloff *et al.* (1977) et adaptée au rat en développement (Nehlig *et al.*, 1988). Le 2-désoxyglucose-^{14}C (125 µCi/kg; activité spécifique 45-60 mCi/mmol, Commissariat à l'énergie atomique, Saclay, France) a été injecté par voie intraveineuse sous forme d'un bolus. Selon le stade étudié, 9 à 20 échantillons de sang artériel ont été prélevés à des temps prédéterminés au cours des 45 min d'expérimentation pour permettre la détermination de la concentration plasmatique et de glucose (Nehlig et coll., 1988a et b). Environ 45 min après l'administration de 2DG, les animaux ont été sacrifiés par décapitation. Les cerveaux ont été rapidement prélevés, congelés dans du méthylbutane refroidi à –35°C, enrobés dans du milieu d'inclusion (carboxyméthylcellulose à 4% dans l'eau) et stockés à –80°C. Les cerveaux ont ensuite été sectionnés en coupes transversales de 20 µm d'épaisseur dans un cryostat à –22°C. Les coupes cérébrales ont ensuite été soumises à une autoradiographie sur du film Kodak SB5 en même temps que des standards de méthylméthacrylate (^{14}C) (Amersham, Arlington Heights, Etats-Unis) calibrés (Nehlig *et al.*, 1988a et b). Des coupes adjacentes ont été prélevées et colorées à l'aide de thionine pour l'identification histologique de structures spécifiques.

Les autoradiogrammes ont été analysés en densitométrie quantitative à l'aide d'un système d'analyse d'images (Biocom 200, France) ou d'un microdensitomètre manuel (Macbeth TD 901, Kollmorgen Co., Newburgh, Etats-Unis). Les mesures de densité optique de chaque structure définie anatomiquement selon l'atlas de Paxinos et Watson (1982) pour les rats adultes et selon l'atlas de Sherwood et Timiras (1970) pour les rats en développement ont été réalisées bilatéralement dans un minimum de quatre coupes adjacentes.

L'utilisation de glucose a été calculée à partir de la concentration tissulaire locale de ^{14}C, de l'évolution des teneurs plasmatiques en glucose et 2DG et des constantes cinétiques appropriées selon l'équation opérationnelle de la méthode (Sokoloff *et al.*, 1977), modifiée pour la mesure de l'utilisation cérébrale de glucose chez le rat immature libre de se mouvoir (Nehlig *et al.*, 1988a et b).

Etudes comportementales

Animaux et traitement pharmacologique

Pour l'étude comportementale, les animaux ont été accouplés selon les mêmes modalités que pour l'étude biochimique et maintenus dans des conditions standard d'élevage avec, cependant, un cycle jour/nuit de 12 heures inversé (lumières allumées à 18 h 00). Cette inversion de cycle a été réalisée de manière à étudier le comportement des animaux au début du cycle nocturne correspondant à leur période d'activité. Après la naissance, les portées ont été réduite à 6 rats mâles. Les animaux ont été traités de la même manière que dans l'étude précédente par du PhB à la dose de 50 mg/kg/j du 2e au 35e jour de la vie postnatale. Les animaux témoins ont reçu un volume équivalent de sérum physiologique. Douze portées témoins et 12 portées de rats traités au PhB ont été utilisées pour cette étude. Le comportement des animaux a été testé à l'âge de 70 à 90 jours. Tous les tests comportementaux ont été réalisés au début de la période sombre du cycle jour/nuit. L'éclairage a été fourni par une lampe rouge incandescente de manière telle que les différentes parties de l'*open field* et que toutes les branches des deux labyrinthes aient été éclairées de manière uniforme.

Comportement en open field

L'activité locomotrice de 11 animaux témoins et 14 rats traités au PhB a été testée dans un *open field* (90x90 cm) dont le sol a été divisé en 36 carrés de taille identique (15x15 cm). Chaque animal a été déposé délicatement dans un angle de l'*open field* et orienté toujours dans la même direction. Le nombre total de carrés traversés de même que le nombre de redressements et de toilettage ont été comptabilisés par deux observateurs entraînés dont l'un n'a pas eu connaissance de la nature du traitement des animaux.

Alternance spontanée

L'alternance spontanée a été testée sur 28 animaux témoins et 28 rats traités au PhB. Le test a été réalisé dans un labyrinthe en T fait en bois peint en gris moyen avec des parois de 15 cm de haut et constitué d'un compartiment de départ (15x15 cm), d'un tronc commun (35x15 cm) et de deux bras (50x15 cm chacun). Pour chaque essai, l'animal a été placé dans le compartiment de départ fermé par une porte guillotine. Au moment où l'animal s'est trouvé en face de la porte, celle-ci a été levée pour lui permettre l'accès au labyrinthe. Dès que le rat a atteint l'un des deux bras du labyrinthe en T (lorsque les quatre pattes ont dépassé l'embranchement), il a été sorti du labyrinthe et remis dans le compartiment de départ. Après un délai de 30 s, la porte a de nouveau été ouverte. Pendant 5 jours consécutifs, une alternance (soit deux entrées) a été testée par animal et par jour. Lorsqu'un rat n'a pas réussi l'un de ses essais en un temps maximal de 5 min, il a été sorti du labyrinthe et cet essai a été considéré comme une erreur pour le jour du test. De plus, le temps écoulé entre l'ouverture du compartiment de départ et l'entrée dans l'une des deux branches du T a également été mesuré.

Comportement dans un labyrinthe à huit branches

Le comportement de 16 animaux témoins et 16 rats traités au PhB a été testé dans un labyrinthe à huit branches. Ces animaux ont au préalable subi une diète hydrique pour ramener leur poids à 85% de sa valeur initiale et ont été maintenus à ce poids pendant

toute la durée du test. Les animaux ont été testés dans un labyrinthe radial à huit branches en bois gris. Chacune des branches (60x12x17 cm, longueur x largeur x hauteur) représente la projection d'un côté d'une plate-forme octogonale centrale de 50 cm de diamètre. Des boulettes de nourriture (45 mg) ont été placées à l'extrémité de chacune des branches avant chaque essai. Ces boulettes n'ont pas été remplacées au cours du test si bien qu'un maximum de huit boulettes de nourriture a pu être obtenu. Au début de chaque test, le rat a été placé sur la plate-forme centrale en face du même bras pour tous les essais et tous les rats. Les animaux ont été laissés dans le labyrinthe jusqu'à ce qu'ils aient visité toutes les branches ou que 15 min se soient écoulées. Le placement des quatre pattes dans une branche a été comptabilisé comme une entrée. Le temps d'entrée dans les branches, la nature de la branche visitée et l'ordre dans lequel celles-ci ont été visitées ont été relevés. Tous les rats ont été testés pendant 5 jours, à raison d'un test par jour. Les animaux qui n'ont pas visité les huit branches du labyrinthe dans le temps accordé, soit 15 min, ont été retirés du labyrinthe et éliminés de l'expérience.

Analyses statistiques

Pour étude biochimique, un t-test de Student a été utilisé pour la mesure des différences entre les animaux témoins et les animaux traités au PhB. En plus de ce test, pour la mesure de l'utilisation cérébrale locale de glucose, les valeurs d'utilisation de glucose à chaque stade du développement ont été comparées à celle du stade précédent, aussi bien dans le groupe des rats témoins que dans celui des animaux traités au PhB, à l'aide d'un t-test de Bonferroni pour comparaison multiples (Kirk, 1968). Cette procédure de comparaison multiples a été choisie pour réduire l'éventualité d'erreurs de 2e espèce en raison du nombre élevé d'analyses réalisées.

Pour les études comportementales, les données d'*open field* et d'alternance spontanée ont été analysées à l'aide d'un test U de Mann-Whitney (Siegel, 1956). Les données du comportement en labyrinthe à 8 branches ont été analysées à l'aide d'un modèle statistique développé pour cette étude (voir appendice statistique).

Résultats

Effets généraux du traitement au phénobarbital

Entre 7 et 14 jours, au moment où la barbitémie des rats mesurée 3 heures après l'administration du médicament est élevée (64 à 80 µg/ml), le PhB induit une sédation transitoire sans effet anesthésiant pendant quelques heures. A 17, 21 et 35 jours, alors que les concentrations circulantes de PhB sont diminuées (71, 53 et 41 µg/ml respectivement) et qu'une certaine tolérance au médicament s'est développée, le barbiturique est sans effet sur le comportement ou le tonus musculaire. Au cours des 3 à 4 heures suivant l'injection de PhB, il n'y a pas de variations de la température corporelle, quel que soit l'âge des animaux. Des observations similaires ont été rapportées après l'administration quotidienne de PhB à la dose de 60 mg/kg au cours de la même période (Schain et Watanabe, 1975).

Poids corporel et cérébral

L'administration de PhB a induit une diminution du poids corporel des animaux traités par rapport aux témoins qui a varié de 6 à 14% et a été significative à tous les stades du développement postnatal; elle a persisté à l'âge adulte (fig. 1).

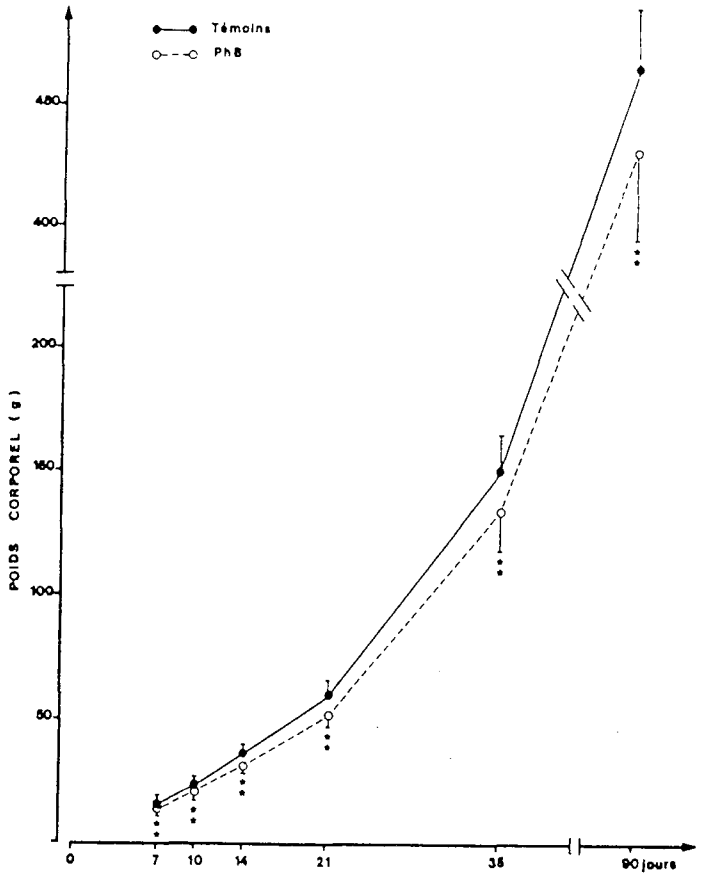


Figure 1. Influence d'un traitement chronique précoce au PhB sur l'évolution postnatale du poids corporel des rats. Les animaux reçoivent une injection sous-cutanée quotidienne de PhB à la dose de 50 mg/kg/j du 2e au 35e jour de vie postnatale.
Les valeurs représentent des moyennes ± D.S. de 17 à 42 animaux.
** P<0.01, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins (test t de Student).

De même, le traitement pharmacologique a provoqué une réduction significative du poids du cerveau qui est apparue à 10 jours, a persisté jusqu'à l'âge adulte et a varié de 6 à 11 % (fig. 2).

Concentrations circulantes de glucose et de composés cétoniques

Ainsi que le montre la figure 3, la glycémie des rats témoins a augmenté entre le 7e et le 10e jour postnatal et n'a plus varié ensuite entre 10 et 35 jours. Au contraire, la glycémie des animaux traités au PhB a augmenté régulièrement tout au long de la période étudiée. Elle a été significativement plus faible chez les animaux traités au PhB que chez les témoins entre 10 et 21 jours (fig. 3).

A 7 jours, la concentration circulante de β–hydroxybutyrate (βHB) et d'acétoacétate (ACA) a été la même chez les animaux témoins et les animaux traités au PhB (fig. 3). Cependant, alors qu'à 7 jours des concentrations circulantes de ces deux composés cétoniques ont atteint leur taux maximal chez les animaux témoins, les teneurs sanguines de βHB et d'ACA ont continué à s'accroître chez les animaux traités au PhB pour atteindre un pic à 14 jours (fig. 3). Les concentrations circulantes de composés cétoniques ont été significativement plus élevées chez les animaux traités au PhB que chez les animaux témoins entre 10 et 35 jours, sauf pour l'ACA à 35 jours.

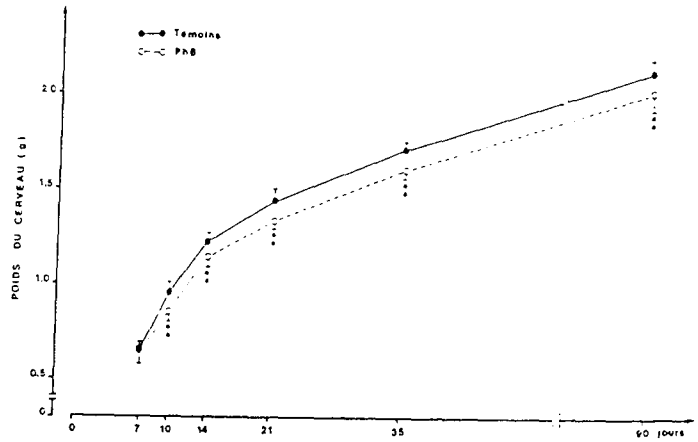


Figure 2. Influence d'un traitement chronique précoce au PhB sur l'évolution postnatale du poids cérébral des rats. Les animaux reçoivent une injection sous-cutanée quotidienne de PhB à la dose de 50 mg/kg/j du 2e au 35e jour de vie postnatale.
Les valeurs représentent des moyennes ± D.S. de 5 à 22 animaux.
** P<0.01, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins (test t de Student).

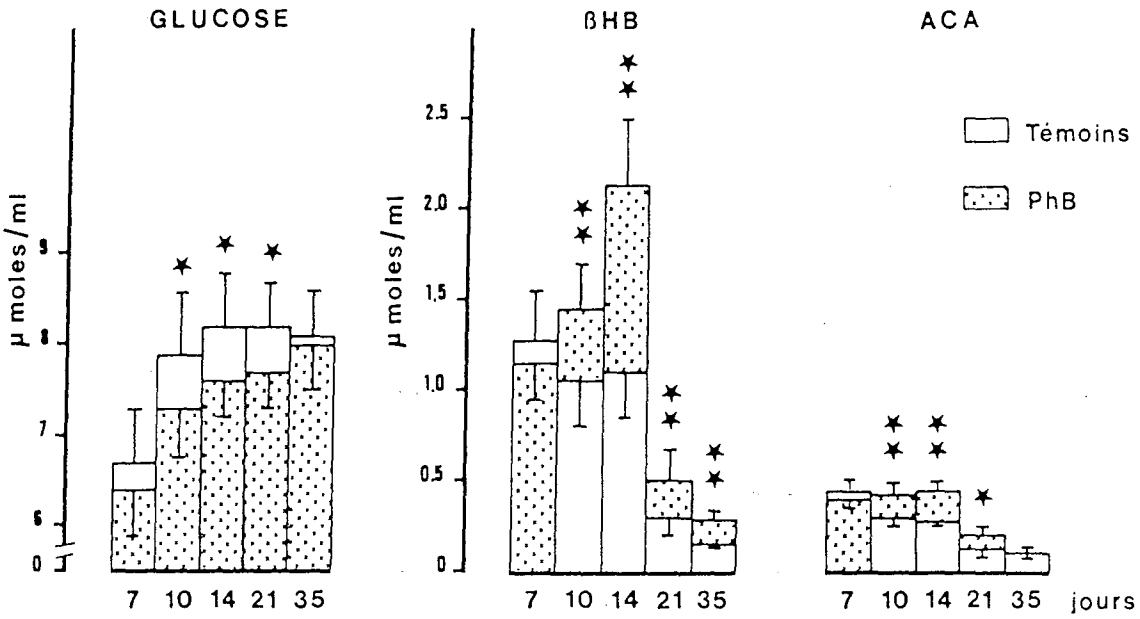


Figure 3. Influence d'un traitement chronique précoce au PhB sur l'évolution postnatale des concentrations circulantes de glucose, β–hydroxybutyrate (βHB) et acétoacétate (ACA). Les animaux reçoivent une injection sous-cutanée quotidienne de PhB à la dose de 50 mg/kg/j du 2e au 35e jour de vie postnatale.
Les valeurs représentent des moyennes ± D.S. de 4 à 12 expériences.
** P<0.05, ** P<0.01, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins (test t de Student).

Incorporation du carbone du glucose-2-^{14}C et du β–hydroxybutyrate-3-^{14}C dans les acides aminés cérébraux

Ainsi que l'indique la figure 4, la biosynthèse des acides aminés à partir du glucose-2-^{14}C a été réduite de 14 à 34% dans le cortex cérébral et le cervelet des animaux traités au PhB par rapport aux témoins à tous les stades du développement postnatal. Dans les structures sous-corticales, il n'y a pas eu de différence entre les deux groupes d'animaux à 7 et 10

jours. En revanche entre 14 et 35 jours, le taux de biosynthèse des acides aminés cérébraux à partir du glucose-2-^{14}C a été réduit de 17 à 26% chez les rats traités au PhB par rapport aux témoins.

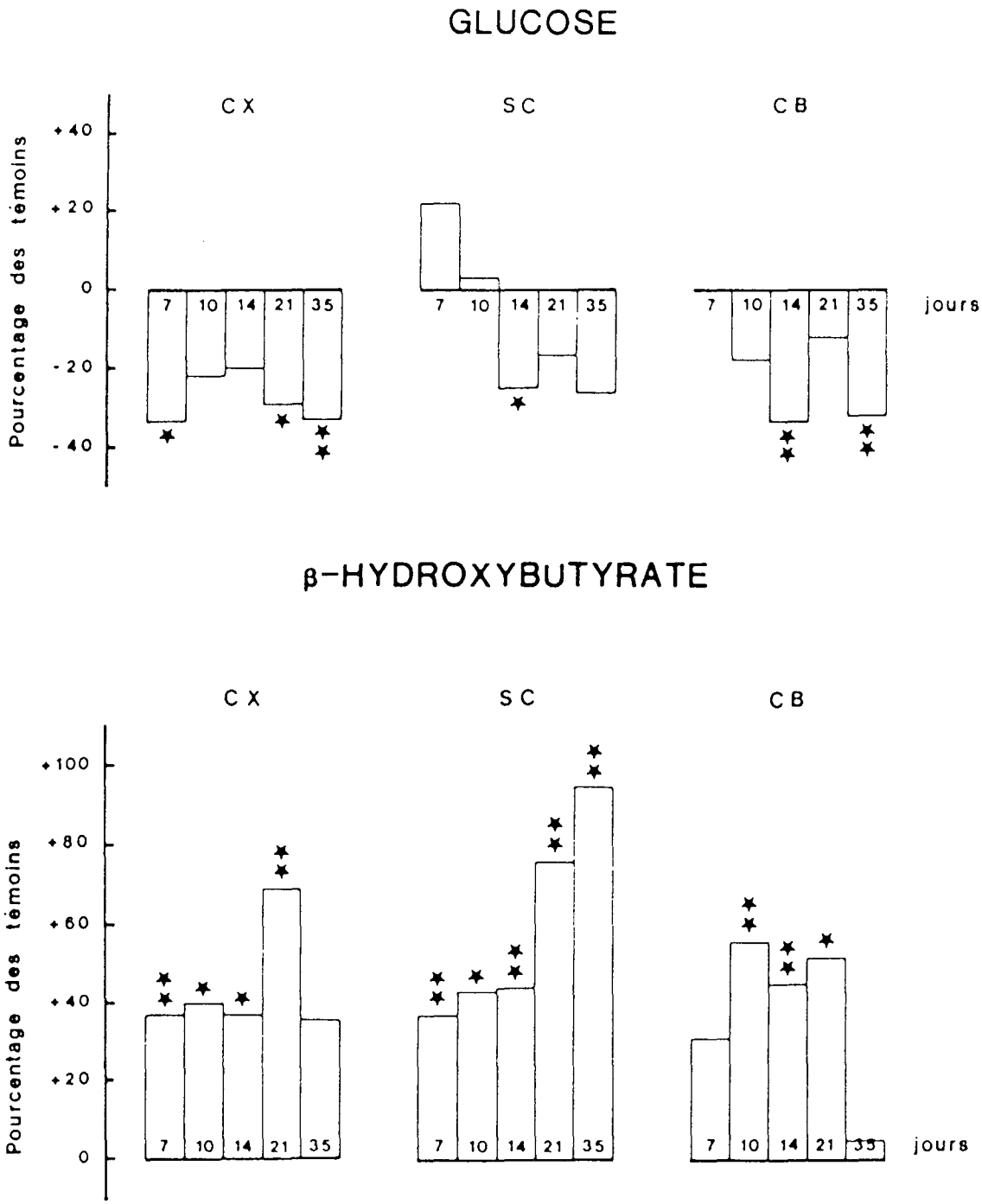


Figure 4. Pourcentage de variation des taux d'incorporation du carbone du glucose-(2-^{14}C), du β-hydroxybutyrate-(3-^{14}C) dans les acides aminés cérébraux au cours du développement postnatal chez les rats traités chroniquement au PhB par rapport aux témoins. Les animaux reçoivent une injection sous-cutanée quotidienne de PhB à la dose de 50 mg/kg/j du 2e au 35e jour de vie postnatale.
* $P<0.05$, ** $P<0.01$, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins (test t de Student).
Abréviations. CX : cortex cérébral; SC : structures sous-corticales; CB : cervelet.

La biosynthèse des acides aminés à partir du β–hydroxybutyrate-3-^{14}C a été augmentée de 32 à 95% dans les trois structures cérébrales et à tous les stades étudiés chez les animaux traités au PhB par rapport aux animaux témoins, sauf dans le cervelet à 35 jours, où elle est identique dans les deux groupes d'animaux (fig. 4).

Utilisation cérébrale moyenne de glucose

Ainsi que l'indique la figure 5, l'utilisation cérébrale moyenne de glucose est significativement réduite chez les rats traités au PhB par rapport aux témoins à tous les stades étudiés sauf à 17 jours. La diminution du taux d'utilisation de glucose induite par le PhB atteint 35 à 45% dans l'ensemble des structures cérébrales à 10 jours, 15 à 25% à 14, 21 et 35 jours et 7 à 26% au stade adulte. Chez les animaux témoins, l'utilisation cérébrale moyenne de glucose est assez faible et ne varie pas de manière significative entre 10 et 17 jours. En revanche, elle s'accroît significativement entre 17 et 21 jours puis entre 35 jours et le stade adulte. Chez les animaux traités au PhB, l'utilisation moyenne de glucose s'accroît entre 14 et 17 jours puis entre 21 et 35 jours ainsi qu'entre 35 jours et le stade adulte (fig. 5).

Utilisation cérébrale locale de glucose

L'utilisation cérébrale locale de glucose (UCLG) a été significativement réduite dans l'ensemble des structures étudiées, c'est-à-dire les système auditif (fig. 6) et visuel (fig. 7), le cortex cérébral (fig. 8), l'hippocampe (fig. 9) et le cervelet (fig. 10) entre 10 et 35 jours de vie postnatale, soit pendant toute la durée du traitement pharmacologique à l'exception du stade 17 jours. A long terme, c'est-à-dire chez l'adulte, l'UCLG est restée significativement plus faible chez les animaux traités au PhB que chez les témoins sauf dans le noyau cochléaire (fig. 6), la collicule supérieure (fig. 7) et l'aire somatosensorielle du cortex frontopariétal (fig. 8).

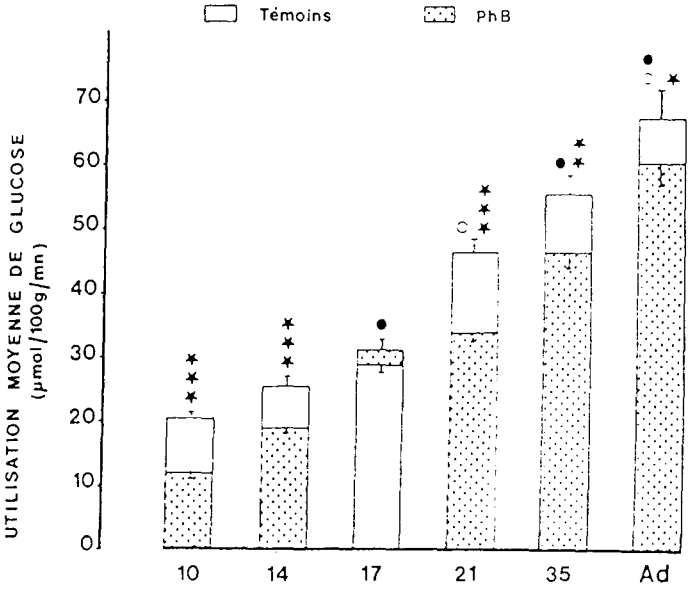


Figure 5. Influence d'un traitement chronique précoce au PhB sur l'évolution postnatale de l'utilisation cérébrale moyenne de glucose. Les animaux reçoivent une injection sous-cutanée quotidienne de PhB à la dose de 50 mg/kg/j du 2e au 35e jour de vie postnatale.
• P<0.05, •• P<0.01, ••• P<0.001, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins à un stade donné du développement (test t de Student); P<0.05, différences statistiquement significatives entre un stade du développement et le stade précédent chez les animaux témoins; P<0.05, différences statistiquement significatives entre un stade du développement et le stade précédent chez les animaux traités au PhB (test t de Bonferroni).
Abréviations. Ad : adulte.

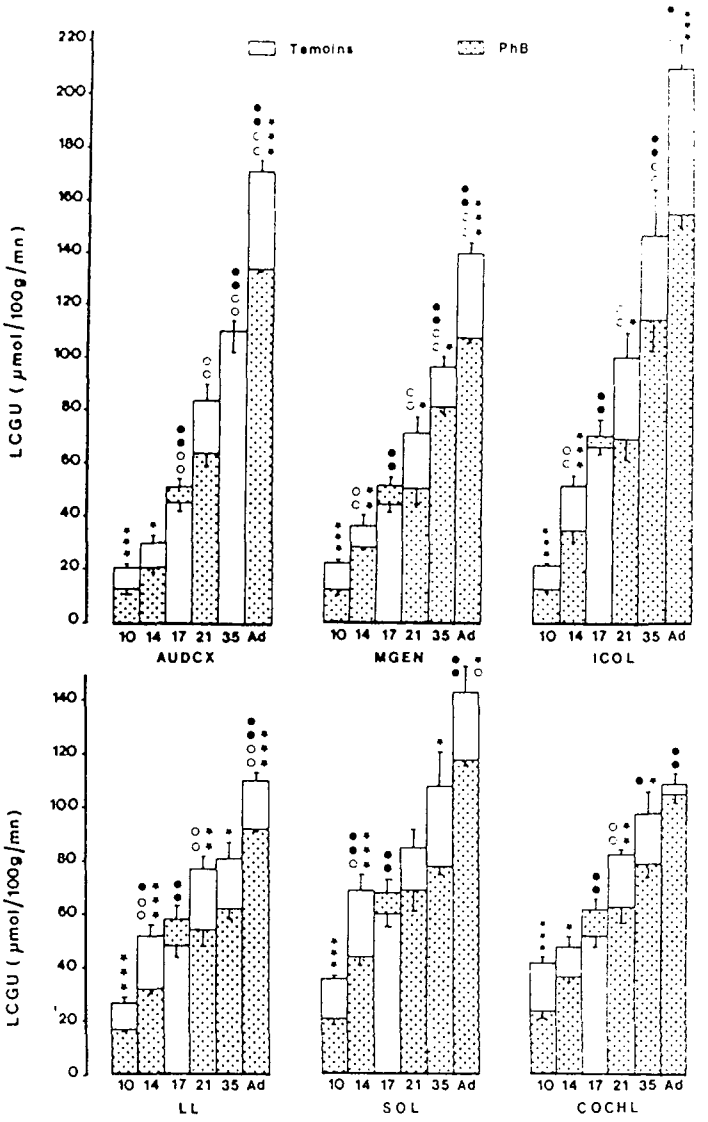


Figure 6. Influence d'un traitement chronique précoce au PhB sur l'évolution postnatale de l'utilisation de glucose dans les structures du système auditif. Les animaux reçoivent une injection sous-cutanée quotidienne de PhB à la dose de 50 mg/kg/j du 2e au 35e jour de vie postnatale.
• P<0.05, // P<0.01, ••• P<0.001, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins à un stade donné du développement (test t de Student); λ P<0.05, λ P<0.01, différences statistiquement significatives entre un stade du développement et le stade précédent chez les animaux témoins; λ P<0.05, λ P<0.01, différences statistiquement significatives entre un stade du développement et le stade précédent chez les animaux traités au PhB (test t de Bonferroni).
Abréviations. Ad : adulte; AUDCX : cortex auditif; MGEN : noyau genouillé médian; ICOL : collicule inférieure; LL : lémnisque latéral, SOL : olive supérieure; COCHL : noyau clochléaire.

Dans l'hippocampe, l'UCLG est restée affectée chez le rat adulte par le traitement pharmacologique dans les trois structures étudiées (fig. 9) tandis que, dans le cervelet, seul le cortex cérébral a été affecté à long terme par le PhB alors que l'UCLG dans les noyaux du cervelet est restée identique dans les deux groupes d'animaux (fig. 10).

En ce qui concerne l'évolution postnatale de l'UCLG dans le groupe de rats témoins, celle-ci augmente de manière significative entre 10 et 14 jours dans quatre structures auditives, le noyau genouillé médian, la collicule inférieure, le lemnisque latéral et l'olive supérieure (fig. 5) et entre 14 et 17 jours dans le cortex auditif (fig. 7). Puis, l'UCLG augmente de manière significative entre 17 et 21 jours dans une majorité de structures chez les rats témoins (fig. 6 à 10). Au contraire, chez les animaux traités au PhB, l'UCLG augmente de manière significative entre 10 et 14 jours dans deux structures auditives, le lemnisque latéral et l'olive supérieure (fig. 6) et dans les trois noyaux du cervelet, dentelé, interposé et fastigial (fig. 10). L'UCLG augmente ensuite de manière significative entre 14 et 17 jours dans l'ensemble des structures étudiées chez les rats exposés au barbiturique

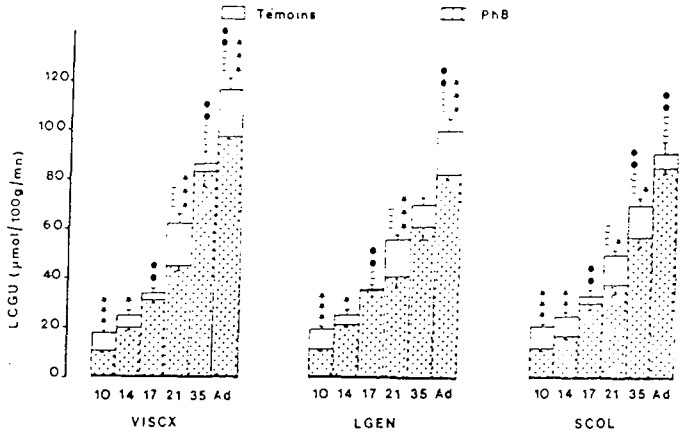


Figure 7. Influence d'un traitement chronique précoce au PhB sur l'évolution postnatale de l'utilisation de glucose dans les structures du système visuel. Les animaux reçoivent une injection sous-cutanée quotidienne de PhB à la dose de 50 mg/kg/j du 2e au 35e jour de vie postnatale.
* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.01, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins à un stade donné du développement (test t de Student); ^ P<0.05, ^^ P<0.01, différences statistiquement significatives entre un stade du développement et le stade précédent chez les animaux témoins; ^ P<0.01, différences statistiquement significatives entre un stade du développement et le stade précédent chez les animaux traités au PhB (test t de Bonferroni).
Abréviations. Ad : adulte; VISCX : cortex visuel; LGEN : noyau genouillé latéral; SCOL : collicule supérieure.

(fig. 6 à 10) mais ne varie plus entre 17 et 21 jours. Au-delà de ce dernier stade, l'évolution des taux d'UCLG a été similaire dans les deux groupes d'animaux; cependant l'UCLG est toujours restée plus faible chez les animaux traités au PhB que chez les témoins.

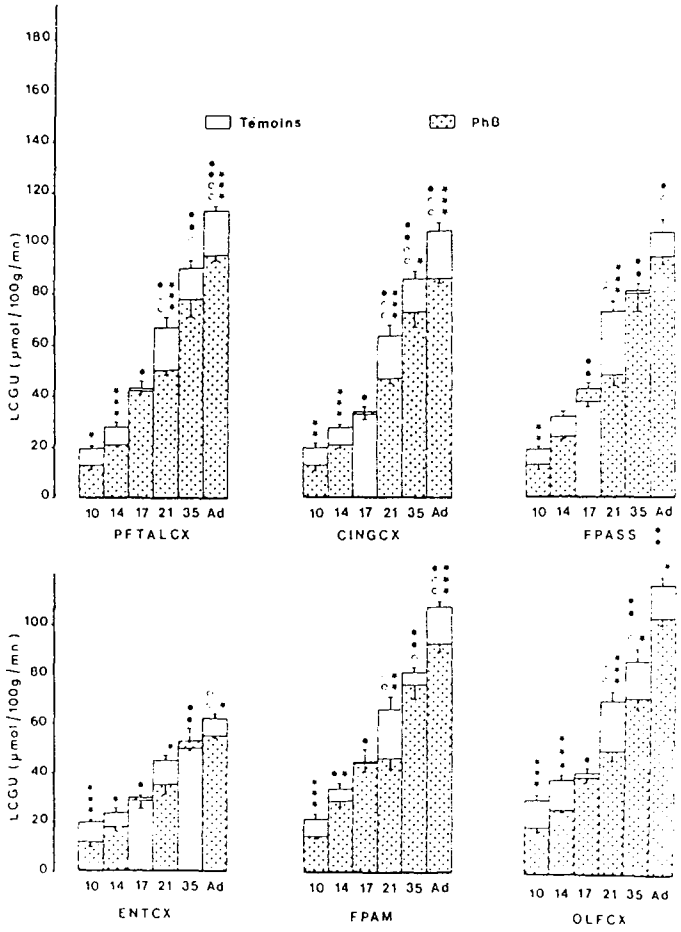


Figure 8. Influence d'un traitement chronique précoce au PhB sur l'évolution postnatale de l'utilisation de glucose dans les aires corticales. Les animaux reçoivent une injection sous-cutanée quotidienne de PhB à la dose de 50 mg/kg/j du 2e au 35e jour de vie postnatale.
* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins à un stade donné du développement (test t de Student); ^ P<0.05, ^^ P<0.01, différences statistiquement significatives entre un stade du développement et le stade précédent chez les animaux témoins; ^ P<0.05, ^^ P<0.01, différences statistiquement significatives entre un stade développement et le stade précédent chez les rats traités au PhB (test t de Bonferroni).
Abréviations. Ad : adulte; PFTALCX : cortex préfrontal; CINGCX : cortex cingulaire; FPASS : aire somatosensorielle du cortex frontopariétal; ENTCX : cortex entorhinal; FPAM : aire motrice du cortex frontapariétal; OLFCX : cortex olfactif.

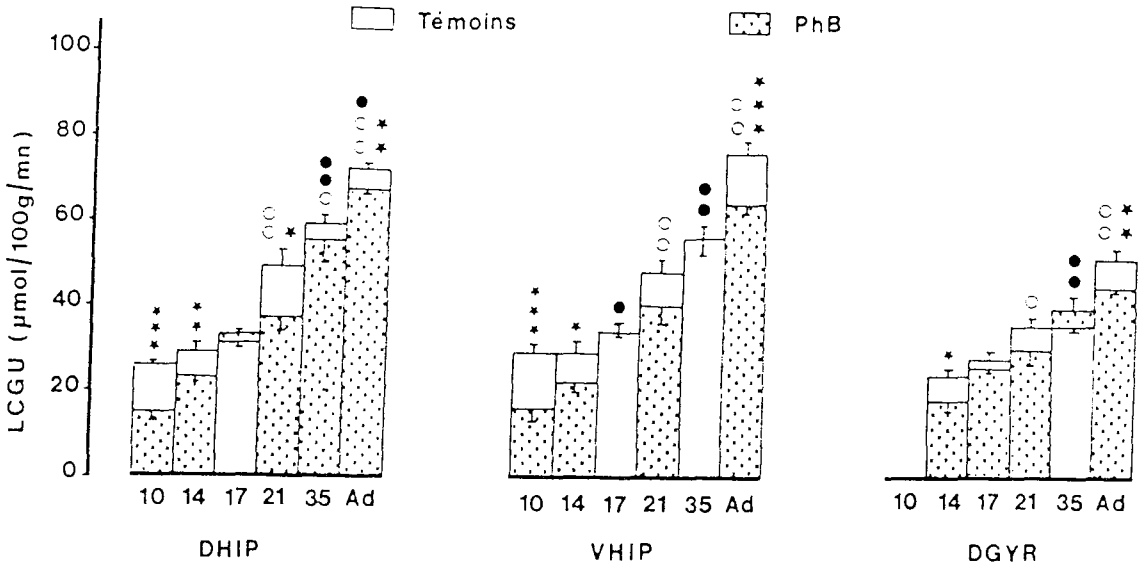


Figure 9. Influence d'un traitement chronique précoce au PhB sur l'évolution postnatale de l'utilisation de glucose dans les structures de l'hippocampe. Les animaux reçoivent une injection sous-cutanée quotidienne de PhB à la dose de 50 mg/kg/j du 2e au 35e jour de vie postnatale.
* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins à un stade donné du développement (test t de Student); ○ P<0.05, ○○ P<0.01, différences statistiquement significatives entre un stade du développement et le stade précédent chez les animaux témoins; ● P<0.05, ●● P<0.01, différences statistiquement significatives entre un stade du développement et le stade précédent chez les rats traités au PhB (test t de Bonferroni).
Abréviations. Ad : adulte; DHIP : hippocampe dorsal; VHIP : hippocampe ventral; DGYR : gyrus denté.

Comportement en open field

Ainsi que l'indique la figure 11, un traitement chronique précoce au PhB n'a affecté significativement aucun des paramètres mesurés dans l'*open field,* soit le nombre total de carrés traversés, le nombre de redressements ou de toilettages comptabilisés au cours d'une période de 5 min.

Alternance spontanée dans un labyrinthe en T

Après un traitement chronique précoce au PhB, le pourcentage d'alternance spontanée a été réduit de 25% par rapport aux animaux témoins (p<0,05).
De plus, le temps nécessaire aux animaux traités au PhB pour accomplir leurs deux essais dans un labyrinthe en T a été allongé d'environ 50 à 400% par rapport aux rats témoins (fig. 12). Cette différence a été statistiquement significative pendant les 5 jours de test et pour les deux essais, sauf pour le deuxième essai au 2e jour.

Comportement dans un labyrinthe à huit branches

Parmi les 16 animaux témoins et les 16 rats traités au PhB testés dans ce labyrinthe, 2 rats dans chaque groupe n'ont pas atteint la performance demandée, soit visiter huit branches différentes en 15 min. Ils ont été retirés de l'étude dans laquelle 14 animaux de chaque groupe ont été pris en considération.

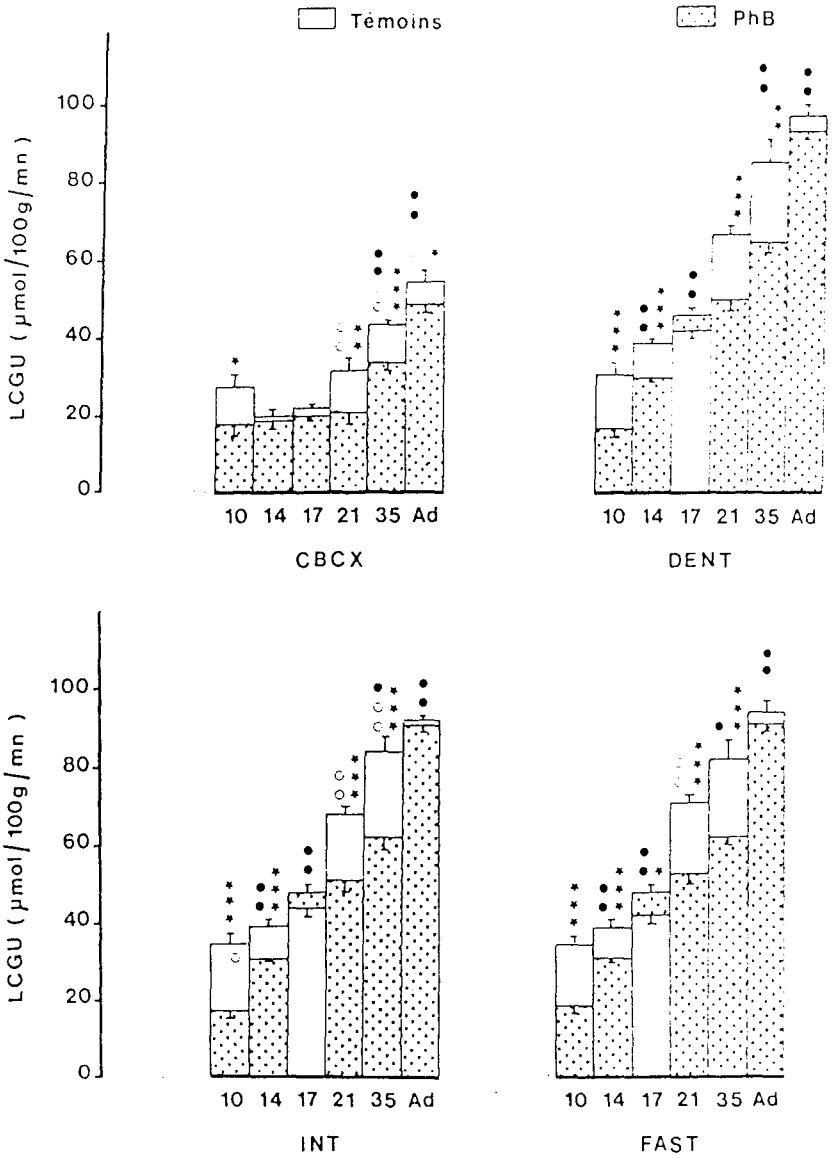


Figure 10. Influence d'un traitement chronique précoce au PhB sur l'évolution postnatale de l'utilisation du glucose dans le cervelet. Les animaux reçoivent une injection sous-cutanée quotidienne de PhB à la dose de 50 mg/kg/j du 2e au 35e jour de vie postnatale.
* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.01, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins à un stade donné du développement (test t de Student); λP<0.05, λP<0.01, différences statistiquement significatives entre un stade du développement et le stade précédent chez les animaux témoins; λP<0.05, λP<0.01, différences statistiquement significatives entre un stade du développement et le stade précédent chez les rats traités au PhB (test t de Bonferroni).
Abréviations. Ad : adulte; CBCX : cortex cérébelleux; DENT : noyau dentelé; INT : noyau interposé; FAST : noyau fastigial.

Si on considère que chaque choix est totalement indépendant des autres, la probabilité de choisir n branches différentes au cours des 8 premiers essais suit une loi binomiale (voir appendice statistique). Si on prend en compte le nombre d'animaux visitant au moins sept branches différentes au cours des huit premiers essais ainsi que l'indique la figure 13, le nombre de rats capables d'atteindre ce critère s'est accru au cours des 5 jours de test, que les rats aient été traités par du sérum physiologique ou du PhB. En revanche, aux jours 1 et 2 du test, l'exposition du barbiturique a induit une diminution du nombre d'animaux capables de visiter sept branches différentes au cours des huit premiers essais par rapport aux rats témoins et a ramené la probabilité d'atteindre ce critère aux jours 1 et 2 pour ces animaux au hasard (ainsi que l'indiquent les flèches sur la figure 13), alors que tous les autres cas ont correspondu à ce qu'on peut appeler un «choix raisonné».

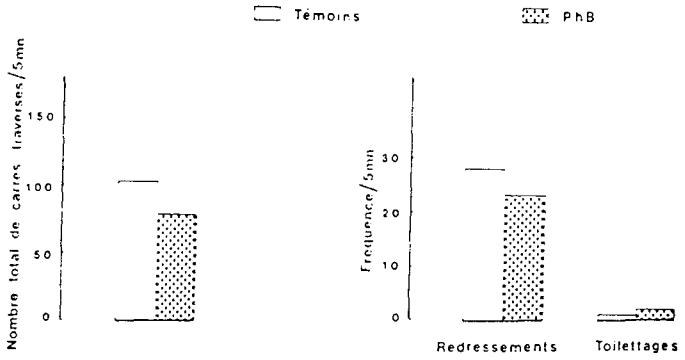


Figure 11. Effets d'un traitement chronique précoce au PhB sur le comportement du rat adulte dans un *open field*. Les rats reçoivent une injection sous-cutanée quotidienne de PhB à la dose de 50 mg/kg du 2e au 35e jour de vie postnatale et sont testés à 80 jours. Les valeurs représentent des médianes du nombre total des carrés traversés et de la fréquence des redressements et des toilettages au cours des 5 min de test chez 11 rats témoins et 14 rats traités au PhB.

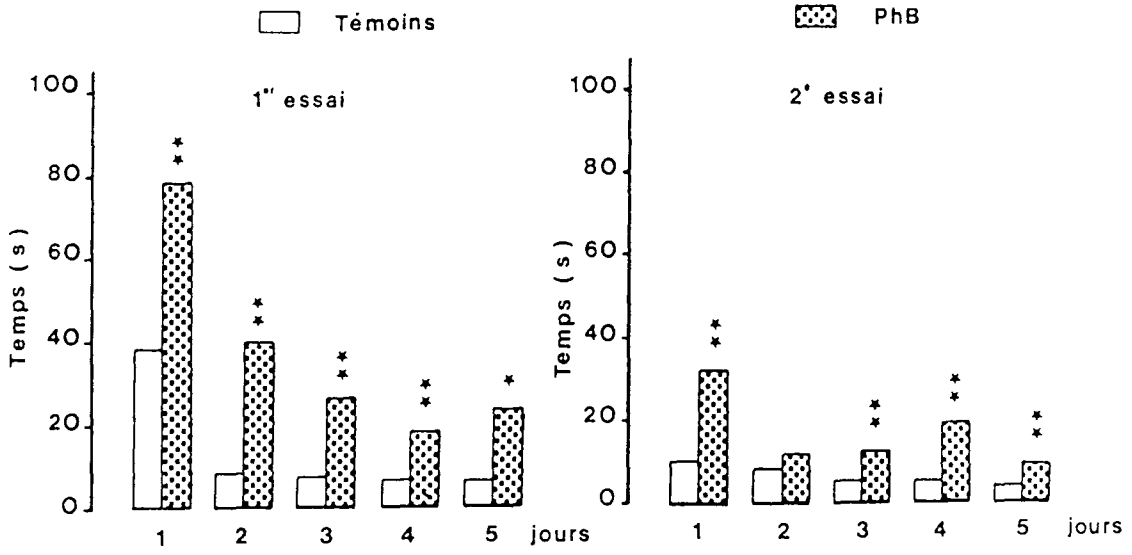


Figure 12. Effets d'un traitement chronique précoce au PhB sur les temps nécessaires pour atteindre une des deux branches du labyrinthe en T au cours des deux essais. Les rats reçoivent une injection sous-cutanée quotidienne de PhB à la dose de 50 mg/kg du 2e au 35e jour postnatal et sont testés à 70 jours. Les graphes représentent des médianes de 27 témoins et 14 rats traités au PhB.
* $P<0.05$, ** $P<0.01$, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins (test U de Mann-Whitney).

Discussion

La dose de PhB administrée aux animaux dans cette étude est très inférieure à la LD 50 pour l'administration parentérale de PhB chez le rat (Barnes et Eltherington, 1973). Cette dose permet d'obtenir des effets anticonvulsivants ainsi que des effets sur la croissance et le comportement similaires à ceux observés lors de traitements anticonvulsivants prolongés chez l'enfant. Bien que les doses de PhB administrées dans l'espèce humaine soient très inférieures à celles utilisées chez le rat, les taux plasmatiques de PhB chez l'enfant et le nouveau-né (Booker, 1982; Painter *et al.*, 1978) sont comparables à ceux obtenus chez des rats traités au PhB à la dose de 50 mg/kg/j (la présente étude) ou même

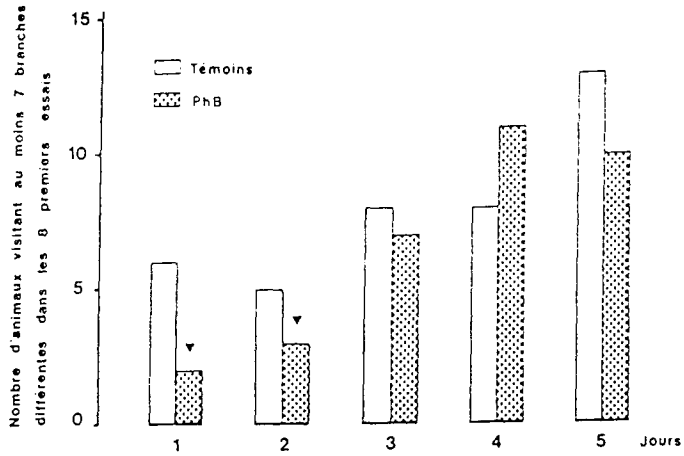


Figure 13. Effets d'un traitement chronique précoce au PhB sur le nombre d'animaux visitant au moins sept branches différentes dans les 8 premiers essais dans un labyrinthe à huit branches. Les rats reçoivent une injection sous-cutanée quotidienne de PhB à la dose de 50 mg/kg du 2e au 35e jour postnatal et sont testés à 90 jours. Les triangles noirs sont pointés sur les groupes d'animaux dans lesquels la probabilité de choisir sept branches différentes dans les huit premiers essais est ramenée au hasard (voir appendice statistique).

de 60 mg/kg/j (Diaz *et al.*, 1977; Schain et Watanabe, 1976). De plus, les jeunes rats tolèrent des doses élevées de barbituriques sans effet apparent sur le comportement (Kuhlmann *et al.*, 1970). Il faut en effet atteindre des doses quotidiennes supérieures à 40 mg/kg de PhB pour observer chez le rat en développement des effets sur la croissance, les constituants biochimiques du cerveau et le comportement (Schain et Watanabe, 1975).

Les résultats de cette étude démontrent qu'un traitement chronique précoce au PhB induit une diminution de l'utilisation du glucose en tant que précurseur de la biosynthèse des acides aminés cérébraux, accompagnée d'un accroissement simultané de l'utilisation du βHB pour la biosynthèse de ces mêmes acides aminés. La dépression de l'utilisation cérébrale locale de glucose induite par le PhB est particulièrement marquée au début de la période postnatale, jusqu'à 14 jours et elle persiste pendant toute la durée du traitement, c'est-à-dire jusqu'à 35 jours. De plus, le PhB induit des effets à long terme sur l'utilisation cérébrale de glucose, qui reste déprimée dans de nombreuses structures chez le rat adulte exposé en période postnatale au barbiturique par rapport aux animaux témoins. Ces effets à long terme du PhB sur le métabolisme énergique cérébral sont également accompagnés par des perturbations des capacités d'apprentissage des animaux ainsi que d'un ralentissement très net des rats exposés au barbiturique dans la réalisation de leurs tests comportementaux.

La conversion rapide du carbone du glucose en acides aminés, caractéristique du métabolisme énergétique du cerveau mature *in vivo*, se développe essentiellement entre 10 et 15 jours chez le rat, pour atteindre vers 22 jours une efficacité similaire à celle de l'adulte (Gaitonde et Richter, 1966). De plus, par suite de la richesse en graisse du lait maternel (Dymsza *et al.*, 1964), le β–hydroxybutyrate est un substrat plus efficace que le glucose pour la biosynthèse des acides aminés cérébraux de la naissance au 15e jour postnatal chez le rat (De Vivo *et al.*, 1973, 1975). Par rapport aux taux de biosynthèse des acides aminés observés chez les rats témoins à partir des deux substrats, glucose ou βHB (Pereira de Vasconcelos *et al.*, 1987a et b) dont l'évolution postnatale est similaire à celle d'études précédentes (De Vivo *et al.*, 1973, 1975; Gaitonde et Richter, 1966), nous avons

UNIVERSITÉ NANCY BIBLIOTHÈQUE-SCIENCES

pu observer que le PhB était capable d'induire des perturbations dans l'équilibre de la balance énergétique cérébrale se traduisant par une diminution de la biosynthèse des acides aminés cérébraux à partir du glucose et par une efficacité accrue du βHB en tant que précurseur de ces mêmes acides aminés (fig. 4). Cependant, ces modifications de la part relative de ces deux substrats à la biosynthèse des acides aminés n'ont pas d'influence sur la concentration cérébrale de ces composés (Pereira de Vasconcelos *et al.*, 1987a). Le cerveau des animaux traités au PhB semble donc dépendre pendant une période plus longue des composés cétoniques pour son métabolisme énergétique et ses biosynthèses. Tout paraît se passer, comme si le cerveau des rats exposés précocement au barbiturique restait plus longtemps dans un état d'immaturité se traduisant par une utilisation accrue de composés cétoniques. La conversion plus active du βHB dans les acides aminés cérébraux des rats traités au PhB par rapport aux témoins est probablement liée à la concentration circulante plus élevée de ce composé cétonique chez les rats exposés au barbiturique (fig. 3). Il est bien connu en effet que les composés cétoniques sont prélevés par le cerveau proportionnellement à leur concentration circulante (Girard et Ferré, 1982; Hawkins *et al.*, 1971; Kraus *et al.*, 1974). Cet accroissement de la concentration circulante de composés cétoniques chez les rats traités au PhB reflète sans doute une biosynthèse accrue de ces substrats métaboliques au niveau du foie. En effet, le PhB est connu pour être un puissant inducteur des enzymes microsomales hépatiques (Ioannides et Parke, 1975; Valerino *et al.*, 1974) et une exposition néonatale au PhB induit un accroissement de l'activité de ces enzymes mais cet effet ne persiste pas après l'arrêt du traitement (Yanai *et al.*, 1985).

La réduction de l'efficacité du glucose en tant que précurseur de la biosynthèse des acides aminés cérébraux chez les rats traités au PhB par rapport aux témoins se traduit par une diminution des taux d'UCLG (fig. 6 à 10). Celle-ci est particulièrement marquée au début du développement postnatal à 10 jours mais également à 14 jours. L'importance de cette dépression de l'UCLG due au PhB entre 10 et 14 jours, à une période de maturation très active des voies du métabolisme glucidique cérébral (Gaitonde et Richter, 1966; Sokoloff, 1973), soulève le problème de l'acquisition des fonctions telles que l'audition qui se produit vers le 12e jour postnatal (Crowley et Hepp-Reymond, 1966; Myslivecek, 1970; Nehlig *et al.*, 1988a et b). En effet, dans un certain nombre d'études utilisant des méthodes autoradiographiques (Abrams *et al.*, 1984; Chugani *et al.*, 1987; Kennedy *et al.*, 1972, 1982), on a montré qu'une augmentation du taux d'utilisation de glucose dans une structure donnée correspond au moment auquel cette structure commence à être impliquée dans une fonction ou un comportement donné. Ainsi, en ce qui concerne la fonction auditive, l'utilisation de glucose s'accroît significativement entre 10 et 14 jours dans quatre structures chez les rats témoins, deux structures postérieures, le lemnisque latéral et l'olive supérieure, le relais mésencéphalique représenté par la collicule inférieure et le relais thalamique qu'est le noyau genouillé médian (fig. 6). Au contraire, chez les rats traités au PhB, l'utilisation de glucose ne s'accroît significativement entre 10 et 14 jours que dans deux structures postérieures, de lemnisque latéral et l'olive supérieure. Il semble donc qu'il puisse y avoir un retard de maturation de la fonction auditive due au traitement par le barbiturique. Ce retard de maturation cérébrale a également été constaté dans l'étude de la biosynthèse des acides aminés cérébraux.

En revanche, pour la vision, dont la maturation se situe aux alentours du 15e jour postnatal, au moment de l'ouverture des yeux, l'UCLG s'accroît de manière significative entre 14 et 17 jours dans le noyau genouillé latéral et cela dans les deux groupes d'animaux. De plus, l'UCLG augmente significativement dans les deux autres structures du système visuel étudiées, le cortex visuel et la collicule supérieure, entre 14 et 17 jours mais cela uniquement dans le groupe d'animaux exposés au barbiturique (fig. 7). Cependant, cet accroissement de l'utilisation de glucose entre 14 et 17 jours chez les rats

traités au PhB n'est pas spécifique des structures du système visuel mais elle est présente dans l'ensemble des aires cérébrales étudiées (fig. 6 à 10). En fait, cette augmentation généralisée de l'utilisation de glucoce à ce stade est le reflet à la fois de la dépression importante de celle-ci à 10 et 14 jours par rapport aux animaux témoins et de l'absence de différence dans les taux d'UCLG à 17 jours entre les animaux témoins et traités au PhB. A ce titre, ce stade de 17 jours est très différent de l'ensemble des autres stades étudiés, auxquels le PhB induit toujours une dépression plus ou moins marquée de l'UCLG. L'absence d'effet du PhB sur l'UCLG du rat de 17 jours ne peut pas être reliée à la glycémie artérielle des animaux. En effet, si celle-ci est significativement plus faible chez les rats traités au PhB que chez les témoins à 10 et 14 jours, la glycémie artérielle est similaire dans les deux groupes d'animaux à partir de 17 jours (résultats non publiés) alors que le PhB induit une dépression généralisée de l'UCLG à 21, 35 jours et au stade adulte. Il paraît donc très difficile de donner une explication satisfaisante à l'absence du PhB sur l'UCLG chez le rat de 17 jours; toutefois, dans des études précédentes sur l'évolution postnatale du couplage entre débit sanguin et métabolisme cérébral, nous avons pu mettre en évidence un découplage entre ces deux paramètres de l'activité fonctionnelle cérébrale précisément à ce stade de 17 jours, alors qu'ils restent couplés à tous les autres stades étudiés (Nehlig *et al.*, 1989a et b). Ce stade représente peut-être une période très particulière et plus vulnérable du développement cérébral.

Néanmoins, le fait que les taux d'utilisation de glucose atteignent à 17 jours des valeurs similaires chez les animaux témoins et traités au PhB modifie totalement le profil de maturation cérébrale après l'exposition précoce du barbiturique. Ainsi, chez les animaux témoins, l'utilisation de glucose s'accroît significativement dans la plupart des structures entre 17 et 21 jours ainsi que nous l'avions démontré dans nos études précédentes (Nehlig *et al.*, 1988a et b). Chez les rats traités au PhB, l'UCLG a tendance à augmenter entre 14 et 17 jours puis de nouveau entre 21 et 35 jours (fig. 6 à 10). Chez le rat adulte, l'UCLG reste significativement déprimée après l'arrêt du traitement au barbiturique dans la plupart des structures étudiées, à l'exception d'une aire auditive, le noyau cochléaire (fig. 6), une aire visuelle, la collicule supérieure (fig. 7), une zone corticale, l'aire somatosensorielle du cortex frontopariétal (fig. 8) et dans les trois noyaux du cervelet (fig. 10). Cette atteinte à long terme des taux d'utilisation de glucose s'accompagne d'une baisse à long terme du poids corporel et cérébral (fig. 1 et 2) ainsi que de perturbations du comportement.

En effet, si l'activité locomotrice globale n'est pas affectée par un traitement chronique précoce des rats au PhB, il n'en est pas de même du comportement en labyrinthe, qui semble affecté en permanence ou de manière transitoire en fonction du test considéré, alternance spontanée ou comportement dans un labyrinthe à huit branches (fig. 12 et 13). L'alternance spontanée est une tendance qu'a l'animal mature à alterner des réponses successives face à des choix équivalents. Ainsi, des rats témoins placés dans un labyrinthe en T tendent à choisir alternativement les deux branches du labyrinthe lors d'essais consécutifs. Dans notre étude, les rats traités au PhB ont un pourcentage moyen d'alternance spontanée sur les 5 jours de test significativement diminué par rapport aux témoins. Ce déficit est accompagné d'un ralentissement très net des animaux dans la réalisation de leurs essais (fig. 12). Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature qui montrent toutefois que l'importance des perturbations comportementales est liée à la période d'exposition à la drogue, prénatale ou néonatale ainsi qu'à l'espèce considérée, rat ou souris et à la dose utilisée (Armitage, 1952; McBride *et al.*, 1985; Murai, 1966; Pick et Yanai, 1984).

Le labyrinthe à huit branches, qui est un test plus complexe que l'alternance spontanée, contient également une composante d'alternance spontanée en raison des choix successifs auxquels l'animal est confronté (Olton et Samuelson, 1976). Or, dans ce test, le nombre de

rats traités au PhB capables de visiter au moins sept branches différentes au cours des huit premiers essais est très inférieur à celui des témoins mais uniquement pendant les deux premiers jours de test (fig. 13). Il semble donc que dans ce cas les perturbations dans les capacités d'apprentissage ne seraient que transitoires. Or la différence entre les deux types de labyrinthe étudiés tient au fait que dans le labyrinthe à huit branches les animaux trouvent au bout de chaque branche visitée une récompense sous forme d'une boulette de nourriture. Au contraire, dans le labyrinthe en T, cette motivation n'existe pas et l'obtention d'une récompense alimentaire est vraisemblablement un très bon stimulant pour les animaux traités au PhB qui, au contraire, ont un comportement très hésitant dans le labyrinthe en T.

Ces comportements d'alternance spontanée sont reliés à l'intégrité de l'hippocampe (Douglas, 1966, 1975) et le comportement dans un labyrinthe à huit branches est très bien corrélé à l'activité électrique de l'hippocampe (Olton *et al.*, 1978). Dans l'étude présente, nous avons pu mettre en évidence des réductions des taux d'UCLG persistant chez le rat adulte en particulier dans l'hippocampe (fig. 9) ou le cortex cérébral (fig. 8) après un traitement chronique précoce au PhB. Néanmoins, en raison de la diversité des résultats obtenus (déficits permanents dans le labyrinthe en T ou, au contraire, performances des rats traités au PhB similaires à celles des témoins dès le jour 3 dans le labyrinthe à huit branches), il est difficile de corréler les réductions des taux d'UCLG dans l'hippocampe aux perturbations comportementales. De plus, contrairement à la souris chez laquelle les déficits cellulaires ont été bien décrits dans l'hippocampe (Yanai et Bergman, 1981; Yanai *et al.*, 1979) et accompagnés de réductions à long terme des performances dans un labyrinthe en T (Pick et Yanai, 1984) ou dans un labyrinthe à huit branches (Pick et Yanai, 1985), chez le rat, à notre connaissance, des destructions cellulaires ont été mises en évidence uniquement au niveau des cellules de Purkinje du cervelet (Hannah *et al.*, 1982, 1988).

En conclusion, les résultats de cette étude démontrent qu'un traitement chronique précoce au PhB induit un déplacement de l'équilibre de la balance énergétique cérébrale en faveur de l'utilisation des composé cétoniques par le cerveau immature. Cette modification se traduit également par une diminution de l'utilisation cérébrale locale de glucose qui atteint l'ensemble des territoires cérébraux étudiés. Cette réduction de l'UCLG est présente pendant toute la durée du traitement au PhB et persiste à long terme chez l'animal adulte dans la plupart des structures étudiées. Cette modification du métabolisme énergétique cérébral est également accompagnée de perturbations comportementales qui se traduisent essentiellement par un ralentissement des animaux traités au PhB dans la réalisation de leurs essais et par une réduction dans les performances d'alternance spontanée. Au contraire, dans un test d'apprentissage avec récompense, comme le labyrinthe à 8 branches, le traitement pharmacologique n'induit que des perturbations transitoires du comportement.

REMERCIEMENTS. Ce travail a été subventionné par l'Institut national de la Santé et de la Recherche médicale (U 272) et par la Fondation pour la Recherche médicale (comité Lorraine). Les auteurs tiennent à remercier le Dr. R. Chermat (société CATPAL, Saint-Berthevin, France), le Pr. B. Krafft et les Drs D. Desor et M. Divry (CNRS UA 233) pour leur aide et leurs conseils judicieux; le Pr J. Roussel (université de Paris - XI, Orsay, France) pour son aide dans la conception du modèle statistique. Les auteurs remercient P. Michel pour le traitement pharmacologique des animaux. Ce travail a bénéficié de l'excellente assistance technique de S. Gesnel et P. Michel. La dactylographie du mémoire a été réalisée par L. Gouret.

Appendice statistique

Modèle statistique

Dans un labyrinthe à huit branches, nous pouvons considérer que l'expérience peut être définie comme les huit premières entrées dans les différentes branches du labyrinthe. Toute expérience de ce type se traduit par une séquence définie d'entrées qui peuvent être représentées comme une permutation avec répétition. Si l'hypothèse est que chaque choix est indépendant de tous les autres, alors les probabilités de visiter n branches différentes au cours des huit premières entrées sont les suivantes : n=8, p= 0.0024; n=7, p=0.0673; n=6, p=0.3196; n=5, p=0.4206; n=4, p=0.1703; n=3, p=0.0193; n=2, p=0.0004; n=1, p=0.

Test statistique

Dans le modèle choisi pour cette étude, $P(X>7)=0.0697=p$, on teste l'hypothèse H_0 avec $P(X\not>7)=0.0697$ (choix au hasard) contre l'hypothèse H_1 avec $P(X>7)>0.0697$ («choix raisonné»).

La variable Z est définie comme le nombre de rats obtenant un score d'au moins sept branches différentes visitées au cours des huit premiers essais, pour un nombre total de 14 rats testés.

Sous H_0, Z suit une loi binominale $\not\beta$ (14; P=0.0697).

Sous H_1, Z suit une loi binominale $\not\beta$ ((14; P>0.0697).

Le test statistique est un test unilatère avec le domaine de rejet de H_0 à droite. Les calculs sont les suivants :

	Probabilités cumulées
P(Z=0)=0.3637	0.3637
P(Z=1)=0.3815	0.7452
P(Z=2)=0.1858	0.9310
P(Z=3)=0.0556	0.9866
P(Z=4)=0.0114	0.9980
P(Z=5)=0.0017	0.9997
P(Z=6)=0.0002	0.9999

Si nous considérons le nombre d'animaux capables de visiter au moins sept branches différentes au cours des huit premiers essais :

Jour 1

Rats témoins : Z=6, P=0.0003 ou P<0.01, l'hypothèse H_0 est rejetée, le choix peut être considéré comme étant un «choix raisonné».

Rats traités au PhB : Z=2, P=0.2548 ou P>0.01, l'hypothèse H_0 est acceptée, le choix ne peut pas être considéré comme étant un «choix raisonné».

Jour 2

Rats témoins : Z=5, P=0.002 ou P<0.01, l'hypothèse H_0 est rejetée, le choix peut être considéré comme étant un «choix raisonné».

Rats traités au PhB : Z=3, P=0.69 ou P>0.01, l'hypothèse H_0 est acceptée, le choix ne peut pas être considéré comme étant un «choix raisonné».

Jour 3

Rats témoins : Z=8, «choix raisonné».

Rats traités au PhB : Z=7, «choix raisonné».

Jour 4

Rats témoins : Z=8, «choix raisonné».

Rats traités au PhB : Z=11, «choix raisonné».

Jour 5

Rats témoins : Z=13, «choix raisonné».

Rats traités au PhB : Z=10, «choix raisonné».

Références

ABRAMS RM, ITO M, FRISINGER JE, PATLACK CS, PETTIGREW KD, KENNEDY C (1984) : Local cerebral glucose utilization in fetal and neonatal sheep. Am J Physiol 246 : R608-R618.

ARMITAGE SG (1952) : The effects of barbiturates on the behavior of rat offspring as measured in learning and reasoning situations. J Comp Physiol Psychol 45 : 146-152.

BARNES CD, ELTHERINGTON LG (1973) : Drug Dosage in Laboratory Animals, A Handbook, 2nd edn. Berkeley : University of California Press.

BOOKER HE (1982) : Relation of plasma concentration to seizure control. In Antiepileptic Drugs, eds Woodbury DM, Penry JK, Pippenger CE. New York : Raven Press, 341-350.

CHUGANI HT, PHELPS ME, MAZZIOTA JC (1987) : Positron emission tomography study of human brain functional development. Ann Neurol 22 : 487-497.

CROWLEY DE, HEPP-REYMOND MC (1966) : Development of cochlear function in the ear of the infant rat. J Comp Psychol 62 : 427-432.

DE VIVO DC, LECKIE MP, AGRAWAL HC (1973) : The differential incorporation of β–hydroxybutyrate and glucose into brain glutamate in the newborn rat. Brain Res 55 : 485-490.

DE VIVO DC, LECKIE MP, AGRAWAL HC (1975) : D-β–Hydroxybutyrate : a major precursor of amino acids in developing rat brain. J Neurochem 25 : 161-170.

DIAZ J, SCHAIN RJ (1977) : Chronic phenobarbital administration : effects upon brain growth and behavior of artificially reared rats. Proc West Pharmacol Soc 20 : 153-157.

DIAZ J, SCHAIN RJ, BAILEY BG (1977) : Phenobarbital-induced brain growth retardation in artificially reared rat pups. Biol Neonate 32 : 77-82.

DOUGLAS RJ (1966) : Transposition novelty and limbic lesions. J. Comp Psychol 62 : 354-357.

DOUGLAS RJ (1975) : The development of hippocampal function. In The Hippocampus Vol 2, ed Isaacson RL, Puibran KH. New York : Plenum Press, 327-361.

DYMSZA HA, CZAJKA DM, MILLER SA (1964) : Influence of artificial diet on weight gain and body composition of the neonatal rat. J Nutr 84 : 100-106.

GAITONDE MK, RICHTER D (1966) : Changes with age in the utilization of glucose carbon in liver and brain. J Neurochem 13 : 1309-1318.

GIRARD J, FERRE P (1982) : Metabolic and hormonal changes around birth. In Biochemical Development of the Fetus and Neonate, ed Jones CT. Amsterdam : Elsevier, 517-551.

HANNAH RS, ROTH SH, SPIRA AW (1982) : The effect of chlorpromazine and phenobarbital on cerebellar Purkinje cells. Teratology 26 : 21-25.

HANNAH RS, ROTH SH, SPIRA AW (1988) : Effect of phenobarbital on Purkinje cell growth patterns in the rat cerebellum. Exp Neurol 100 : 354-364.

HAWKINS RA, WILLIAMSON DH, KREBS HA (1971) : Ketone body utiization by adult and suckling rat brain in vivo. Biochem J 122 : 13-18.

IOANNIDES C, PARKE DV (1975) : Mechanism of induction of hepatic microsomal drug metabolizing enzymes by a series of barbiturates. J Pharm Pharmacol 27 : 739-746.

KENNEDY C, GRAVE JD, JEHLE JW, SOKOLOFF L (1972) : Changes in blood flow in the component structures of the dog brain during postnatal maturation. J. Neurochem 19 : 2423-2433.

KENNEDY C, SUKURADA O, SHINOHARA M, MIYAOKA M (1982) : Local cerebral glucose utilization in the newborne macaque monkey. Ann Neur 12 : 333-340.

KIRK RE (1968) : Experimental Design : Procedures for the Behavioral Sciences, Belmont, CA : Brooks/Cole.

KRAUS H, SCHLENKER S, SCHWEDESKY D (1974) : Developmental changes of cerebral ketone body utilization in human infants. Hopp Seyler's Z. Physiol Chem 335 : 164-170.

KUHLMANN K, ODUAH M, COPER H (1970) : Uber die Wirkung von Barbituraten by Ratten verschiedenen Alters. Arch Pharmak 265 : 310-320.

MCBRIDE MC, ROSMAN NP, DAVIDSON SJ, OPPENHEIMER EY (1985) : Long-term behavioral effects of phenobarbital in suckling rats. Exp Neurol 89 : 59-70.

MELLANBY J, WILLIAMSON DH (1974) : Acetoacetate. In Methods of Enzymatic Analysis Vol 4, ed Bergmeyer HU, Gawehn K. Academic Press : New York, 1840-1844.

MIDDAUGH LD, SANTOS III CA, ZEMP JW (1975) : Effects of phenobarbital given to pregnant mice on behavior of mature offspring. Develop Psychobiol 8 : 305-313.

MIDDAUGH LD, SIMPSON LW, THOMAS TN, ZEMP JW (1981a) : Prenatal maternal phenobarbital increases reactivity and retards habituation of mature offspring to environmental stimuli. Psychopharmacology 74 : 349-352.

MIDDAUGH LD, THOMAS TN, SIMPSON LW, ZEMP JW (1981b) : Effect of prenatal maternal injections of phenobarbital on brain neurotransmitters and behavior of young C57 mice. Neurobehav Toxicol Teratol 3 : 271-275.

MURAI N (1966) : Effect of maternal medication during pregnancy upon behavioral development of offsping. Tohoku J Exp Med 89 : 265-272.

MYSLIVECEK J (1970) : Electrophysiology of the developing brain. Central and eastern european contibutions. In Developmental Neurobiology, ed Himwich WA. Springfield : Charles C Thomas, 475-527.

NEHLIG A, PEREIRA DE VASCONCELOS A, BOYET S (1988a) : Quantitative autoradiographic measurement of local cerebral glucose utilization in freely moving rats during postnatal development. J. Neurosci 8 : 2321-2333.

NEHLIG A, PEREIRA DE VASCONCELOS A, BOYET S (1988b) : Evolution postnatale de l'utilisation cérébrale locale de glucose chez le rat : étude quantitative. Circ Metab Cerveau 5 : 72-87.

NEHLIG A, PEREIRA DE VASCONCELOS A, BOYET S (1989a) : Postnatal changes in local cerebral blood flow measured by the quantitative [^{14}C] iodoantypyrine technique in freely moving rats. J Cereb Blood Flow Metab 9, ~~sous presse.~~ 579 - 588.

NEHLIG A, PEREIRA DE VASCONCELOS A, BOYET S (1989b) : Evolution du couplage entre le débit sanguin cérébral et l'utilisation cérébrale de glucose chez le rat au cours du développement postnatal. Circ Métab Cerveau 6 : 140-159.

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

OLTON DS, BRANCH M, BEST PJ (1978) : Spatial correlates of hippocampal unit activity. Exp Neurol 58 : 387-409.

OLTON DS, SAMUELSON RJ (1976) : Remembrance of places passed. Spatial memory in rats. J Exp Psychol Animal Behav Process 2 : 97-116.

PAINTER M, PIPPENGER C, MACDONALD H, PITLOCK W (1978) : Phenobarbital and diphenylhydantoin levels in neonates with seizures. J Pediat 92 : 312-319.

PATSALOS PN, WIGGINS RC (1982) : Brain maturation following administration of phenobarbital, phenytoin and sodium valproate to developing rats or to their dams : effects on synthesis of brain myelin and other subcellular menbrane proteins. J. Neurochem 39 : 915-923.

PAXINOS G, WATSON C (1982) : The rat brain in stereotaxic coordinates, New York : Academic Press.

Pereira de Vasconcelos A, Nehlig A (1987a) : Effects of early phobarbital treatment on the maturation of energy metabolism in the developing rat brain. I Incorporation of glucose carbon into amino acids. Develop Brain Res 36 : 219-229.

PEREIRA DE VASCONCELOS A, SCHROEDER H, NEHLIG A (1987b) : Effects of early chronic phenobarbital treatment on the maturation of energy metabolism in the developing rat brain. II Incorporation of β–hydroxybutyrate into amino acids. Develop Brain Res 36 : 231-236.

PICK CG, YANAI J (1984) : Long term reduction in spontaneous alternations after early exposure to phenobarbital. Int J Develop neurosci 2 : 223-228.

PICK CG, YANAI J (1985) : Long term reduction in eight arm maze performance after early exposure to phenobarbital. Int J Develop neurosci 3 : 223-227.

SCHAIN RJ, WATANABE K (1975) : Effects of chronic phenobarbital administration upon brain growth in the infant rat. Exp Neurol 47 : 509-515.

SCHAIN RJ, WATANABE K (1976) : Origin of brain growth retardation in young rats treated with phenobarbital. Exp Neurol 50 : 806-809.

SHERWOOD NM, TIMIRAS PS (1970) : A stereotaxic atlas of the developing rat brain. Berkeley : University of California Press.

SIEGEL RJ (1956) : Non-Parametric Statistics for the Behavioral Sciences. New York : McGraw-Hill.

SOKOLOFF L, REIVICH M, KENNEDY C, DESROSIERS MH, PATLAK CS, PETTIGREW KD, SAKURADA O, SHINOHARA M (1977) : The [^{14}C] deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization : theory, procedure, and normal values in the concious and anesthetized albino rat. J Neurochem 28 : 897-916.

VALERINO DM, VESSEL ES, AURORI KC, JOHNSON AO (1974) : Effects of various barbiturates on hepatic microsomal enzymes. A comparative study, Drug Metabol Disp 2 : 448-454.

WILLIAMSON DH, MELLANBY J (1974) : D-(–3)-Hydroxybutyrate. In Methods of Enzymatic Analysis Vol 4, de Bergmeyer HU, Gawehn K. New York : Academic Press, 1836-1839.

YANAI J (1984) : An animal model for the effects of barbiturate on the development of the central nervous system. In Neurobehavioral Teratology, ed Yanai J. Amsterdam : Elsevier, 111-132.

YANAI J, BERGMAN A (1981) : Neuronal deficits in mice following neonatal exposure to barbiturates. Exp Neurol 73 : 199-208.

YANAI J, BERGMAN A, SHAFER R, YEDWAB G, TABAKOFF B (1981) : Audiogenic seizures and neuronal deficits following early exposure to barbiturate. Dev Neurosci 4 : 345-350.

YANAI J, ISER C (1981) : Dendritic deficits in the Purkinje cells following early exposure to phenobarbital. Exp Neurol 74 : 707-716.

YANAI J, POSSELI-AUSTIN L, TABAKOFF B (1979) : Neuronal deficits in mice following prenatal exposure to phenobarbital. Exp Neurol 65 : 237-244.

YANAI J, WANICH A (1985) : Prenatal versus neonatal long-term effect of phenobarbital on mouse microsomal drug-oxidizing system. Biol Neonate 48 : 269-273.

Short- and long-term effects of an early chronic phenobarbital treatment on the maturation of cerebral energy metabolism and on behavior

A. Pereira de Vasconcelos, C. Colin, S. Boyet, A. Nehlig

Summary. The influence of phenobarbital (PhB) on postnatal evolution of several aspects of cerebral energy metabolism and on behavior was studied in the rat. Animals were treated from postnatal day 2 to 35 by a subcutaneous injection of PhB at a dose of 50 mg/kg/d or by saline. Rats were studied at 7, 10, 14, 17, 21 and 35 days at the adult stage. PhB treatment induced a decrease of body and brain weight at all studied stages. Circulating levels of glucose were decreased whereas blood concentrations of ketone bodies were increased by PhB. Barbiturate exposure decreased cerebral amino acid biosynthesis from glucose and simultaneously increased that from β-hydroxybutyrate. Local cerebral glucose utilization measured by quantitative autoradiography was reduced in PhB- as compared to saline-treated rats, not only during the pharmacological exposure, i.e. until 35 days, but also in the adult rat. These long-term depressions of energy metabolism induced by PhB were accompanied by behavioral perturbations. The percentage of spontaneous alternation was reduced in PhB-treated animal which, in addition, were much slower than controls to perform their behavioral task. However, in an eight arm maze, perturbations of learning capacities of PhB-exposed animals disappeared after 2 days of testing.

Key words : Cerebral energy metabolism, Glucose, β-hydroxybutyrate, Phenobarbital, Chronic treatment, 2-[^{14}C] deoxyglucose, Postnatal development, Behavior, Rat.

Auteur principal : Dr Anne Pereira de Vasconcelos, INSERM U 272, 30, rue Lionnois, BP 3137 54013 Nancy Cedex France. *Tél.* 83.37.35.59.

MEMOIRE G

Journal of Neurochemistry
Raven Press, Ltd., New York
© 1988 International Society for Neurochemistry

Morphological and Neurochemical Effects of Diazepam and Phenobarbital on Selective Culture of Neurons from Fetal Rat Brain

Jean-Luc Daval, Anne Pereira De Vasconcelos, and Isabelle Lartaud

INSERM U. 272, Pathologie et Biologie du Développement Humain, Université de Nancy I, Nancy, France

Abstract: The responses to diazepam (DZ) and phenobarbital (PhB) were studied in enriched neuronal primary cultures from rat embryo hemispheres. Cells were grown in chemically defined medium and the drugs were added for 3 days to cultures, at pharmacologically active concentrations. Following exposure to DZ or to PhB, morphological changes, such as less prominent neuronal processes, were observed in neurons. It was also shown that each drug reduced the specific uptake of 2-deoxy-D-glucose by the cells and interfered with protein and RNA metabolism. It was concluded that both DZ and PhB might affect, at least transiently, the normal growth of neurons in culture. **Key Words:** Primary cultured neurons—Development—Diazepam—Phenobarbital—2-Deoxyglucose uptake. **Daval J.-L. et al.** Morphological and neurochemical effects of diazepam and phenobarbital on selective culture of neurons from fetal rat brain. *J. Neurochem.* **50**, 665–672 (1988).

Diazepam (DZ) and phenobarbital (PhB) are routinely used in pregnant women and in neonates (Forfar and Nelson, 1973). Despite extensive exposure to these drugs during early development, information about their long-term effects on the CNS is relatively scarce. Anticonvulsant drugs, such as DZ and PhB, are effective because of their capacities to reduce the excitability of neuronal membranes and their effects on neurotransmitter metabolism (Garattini et al., 1977; Schulz and MacDonald, 1981; MacDonald and McLean, 1986). However, these actions might affect the energy metabolism of neurons, alter the availability or effectiveness of neurotransmitters, and finally induce disturbances of metabolic pathways necessary for the normal development of the brain (Wallace, 1984). So, an increased incidence of birth defects and mental retardation has been reported in children of women who ingested anticonvulsant medications during their pregnancy (Speidel and Meadow, 1972; Hill, 1973).

The present study has attempted to determine if DZ and PhB, at concentrations close to those achieved in the CNS during clinical use, had the capacity to affect the growth of rat neurons in primary dissociated cell culture. The influence of the drugs has been studied on the development of neurons grown in serum-free chemically defined medium, by examining their effects on cell morphology, cell survival, glucose transport, and protein and RNA metabolism.

MATERIALS AND METHODS

Animals

When they were in the proestrous period, as shown by the observation of daily vaginal smears, Sprague–Dawley female rats were housed with a male for 24 h. They were then separated during their pregnancy and maintained under standard laboratory conditions with food and water available ad libitum.

Cell cultures

The neuronal cell cultures were obtained from 14-day-old rat embryos by a modification of the method previously described for culture of chick embryo neurons (Daval et al., 1983). Cerebral hemispheres were dissected free of meninges and gently dispersed in a mixture of Dulbecco-modified Eagle's medium (DMEM) and Ham's F12 medium (50:50) supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum,

Received April 15, 1987; revised manuscript received August 1, 987; accepted August 25, 1987.
Address correspondence and reprint requests to Dr. J. L. Daval t Unit on Neurochemistry, BPB, NIMH, Building 10, Room C-210, Bethesda, MD 20892, U.S.A.

Abbreviations used: 2-DG, 2-deoxy-D-glucose; DMEM, Dulbecco-modified Eagle medium; DZ, diazepam; HEPES, *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid; PhB, phenobarbital; SFM, serum-free medium; SSM, serum-supplemented medium; TCA, trichloroacetic acid.

penicillin (25 U/ml) and streptomycin (25 μg/ml). The cell suspension was then centrifuged at 700 *g* for 10 min. The pellet was redispersed in the same serum-supplemented medium (SSM) and filtered through a fine nylon mesh (46 μm pore size). The final concentration of the cell suspension was adjusted to 10^6 cells/ml of medium and aliquots of 1 ml of the cell suspension were transferred into 35 mm diameter Petri dishes (Falcon) precoated with poly-L-lysine (1 mg/100 ml) dissolved in water (Yavin and Yavin, 1974) and pre-incubated at 37°C with 2 ml of SSM before seeding. Cells were constantly maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2/95% air. On the third day of culture, the medium was removed and replaced with a fresh hormonally defined serum-free medium (SFM) consisting of the DMEM/Ham's F12 nutrient medium supplemented with 100 μg/ml of human transferrin, 5 μg/ml of insulin, 0.1 m*M* putrescine, 10 n*M* progesterone, 1 p*M* 17β-estradiol, and 30 n*M* Na selenite (Bottenstein and Sato, 1979; Faivre-Baumann et al., 1981).

Treatments by DZ or PhB were started on day 3 or on day 6 after plating by transferring the cultures to SFM containing the appropriate concentration of the tested drug dissolved in a small volume of ethanol, and were continued for a further 3-day period. The pH of the culture medium was not noticeably altered by any of the drug additions.

Evaluation of morphological parameters

Morphological observations of the cultured cells were routinely performed by means of a Nikon inverse phase-contrast microscope (model Diaphot TMD).

Cells were processed for total counts and determination of viable cell number using a hemocytometer and 0.4% trypan blue stain. In three separate experiments, silver staining of cultures was performed by a modification of the Bodian protargol procedure, as previously described by Zagon and Lasher (1977) to allow visualization of fine processes of the cells.

In some experiments, over 100 fields of control and drug-treated cultures were observed through the microscope and a scale from 0 to 5 was used to score the number of cellular aggregates comprised of 10 or more cells in contact with one another, the number of neuronal-like cells and glial-like cells, the number of cells with processes and the length of the processes.

2-Deoxy-D-glucose (2-DG) transport

The uptake of [^{3}H]2-DG was assayed on cultures previously incubated for 3 days in the presence of DZ or PhB, either from day 3 to day 6 (cell proliferation period) or from day 6 to day 9 (cell maturation period) (Pettmann et al., 1979; Borg et al., 1985).

The dishes were washed twice in a *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES)-buffered Krebs–Ringer solution (125 m*M* NaCl, 4.8 m*M* KCl, 1.2 m*M* $MgSO_4$, 1.3 m*M* $CaCl_2$, 1.2 m*M* KH_2PO_4, 25 m*M* HEPES, pH 7.40) and incubated in 2 ml of the Krebs–Ringer medium for 15 min, at 37°C. The medium was then discarded and the assay was initiated by adding 1 ml of the buffer solution containing 1 m*M* [^{3}H]2-DG (1 μCi/ml; specific activity 16 Ci/mmol). The incubation was continued for a chosen time, ranging from 2 to 40 min.

At the end of the incubation period, the radioactive medium was quickly removed and the cultures were rapidly washed three times with physiological saline. After drying, the cells were solubilized in 1 ml of 1 *M* NaOH and aliquot were taken for scintillation counting and protein determi nation (Miller, 1959). Specific uptake of [^{3}H]2-DG wa measured by incubating the cells in the presence or in th absence of an excess of nonradioactive D-glucose (10 m*M*). At a concentration of 1 m*M* [^{3}H]2-DG, the specifi uptake was about 90–95% of the total uptake.

L-Leucine and uridine incorporation

Incorporation of radiolabeled leucine into protein wa performed on 5-day-old cultures that had been grown i SFM containing 10^{-5} *M* DZ or 5×10^{-4} *M* PhB, since da 3. The culture medium was discarded and the cells wer incubated in 2 ml of SFM in the presence of L-[^{14}C]leucin (1 μCi/ml; specific activity 56 mCi/mmol) with DZ or PhI After 24 h at 37°C, [^{14}C]leucine incorporation into aci soluble and acid-insoluble material was assayed. Cultur were washed twice with ice-cold saline and treated for 2 min with 10% trichloroacetic acid (TCA) at 4°C. TCA-so uble radioactivity was then removed and the cells we washed twice with 0.5 ml of ethanol. The TCA-insolub fraction remaining on the bottom of the culture dishes w solubilized in 1 ml of 1 *M* NaOH. After scraping off tl cells with a rubber policeman, aliquots were taken for dete mination of the radioactivity and for protein measuremer The acid-soluble pool was combined with the two ethan washes and aliquots were used after evaporation for TC soluble radioactivity determination.

Incorporation of radiolabeled uridine into acid-solut and acid-insoluble pools was performed on 5-day-old cu tures previously treated with 10^{-5} *M* DZ or 5×10^{-4} *M* Pl for 2 days. Cells were incubated at 37°C in 2 ml of SF containing [(U)-^{14}C]uridine (1 μCi/ml; sp act, 517.5 m(mmol) in the presence of the tested drug. After 48 h, c mulative [^{14}C]uridine incorporation into TCA-soluble a TCA-insoluble material was measured. Experimental pr cedure was as stated for leucine incorporation measu ments.

Neuronal cell cultures grown in SFM were treated in t same way as for controls.

Materials

Culture media and fetal calf serum were obtained fr Flow Laboratories (Puteaux, France). Penicillin and str tomycin were from GIBCO-BRL (Cergy-Pontoise, Franc Poly-L-lysine (35,000–70,000 MW), human transferr bovine insulin, putrescine, progesterone, and 17β-estrad were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, M U.S.A.). Phenobarbital (5-ethyl, 5-phenylbarbituric acid dium salt) was from Fluka (Buchs, Switzerland), wher diazepam was kindly provided by Roche SA, France. Deoxy-D-[1-^{3}H]glucose and L-[1-^{14}C]leucine were from Radiochemical Centre Amersham (Bucks, U.K.) and [(1 ^{14}C]uridine was from New England Nuclear (Boston, M U.S.A.). All other reagents were of the highest grade cc mercially available.

Radioactive material was measured by means of a Be man scintillation spectrometer, model LS-1801.

RESULTS

Morphology

Within 24 h after plating, most of the cells l attached to the poly-L-lysine substratum. The c showed a round phase-bright body with some n

rites that began to extend. On day 6, after 3 days in SFM, cultures exhibited many living neuronal cells, as shown by trypan blue coloration, with very few nonneuronal elements (i.e., glioblasts and fibroblasts). At this stage of development, cultures could be characterized by polygonal perikarya (average size, 82 ± 18 μm) interconnected by a dense fiber network (Fig. 1A). On the ninth day after seeding, cell bodies became largest (average size, 130 ± 19 μm) and the neurite processes more complex. Formation of cellular clumps occurred, showing stellate-shaped aggregates with abundant neuritic arborization (Fig. 1B).

After 3 days in vitro, transfer of cultures from SSM to SFM containing 5×10^{-6} *M* DZ or 10^{-4} *M* PhB seemed to have no effect either on cellular morphology or on culture growth, when observed on day 6. By contrast, 10^{-5} *M* DZ and particularly 5×10^{-4} *M* PhB appeared to reduce cell proliferation, as shown by the fiber outgrowth which became less extensive during the following days (Table 1). However, most of the neurons had the capacity to survive and to develop. Three days after DZ removal, it appeared that neuronal processes remained significantly less abundant than in control cultures and fine processes could not be seen, using Bodian staining procedure, suggesting some irreversible alteration in cell connections. The same effects were observed 3 days after exposure to PhB (5×10^{-4} *M*). By contrast with 9-day-old control cultures which exhibited a large number of cellular aggregates, DZ- and PhB-treated cultures showed isolated cells among smaller aggregates, when observed 3 days after drug removal (Table 1).

At the concentrations of 10^{-4} *M* and 10^{-3} *M*, respectively, DZ and PhB induced the appearance of signs of degeneration, such as fragmentation with, sometimes, retraction of some neurites. When used at a higher concentration, both of the drugs were responsible for cellular death with massive detachment of the cells, and it was shown that control vehicle, at the concentration used, had no effect by itself.

When added to the culture medium between day 6 and day 9 in vitro, 10^{-5} *M* DZ and 5×10^{-4} *M* PhB slightly altered the density of the neurite network, with noticeable reduction in the cell number (Fig. 1C and D).

2-DG transport

In 6-day-old neuronal cultures, the rate of uptake of [^{3}H]2-DG was observed to be quite constant in the first 20 min of incubation at 37°C, then reached a steady-state level between 20 and 40 min (Fig. 2).

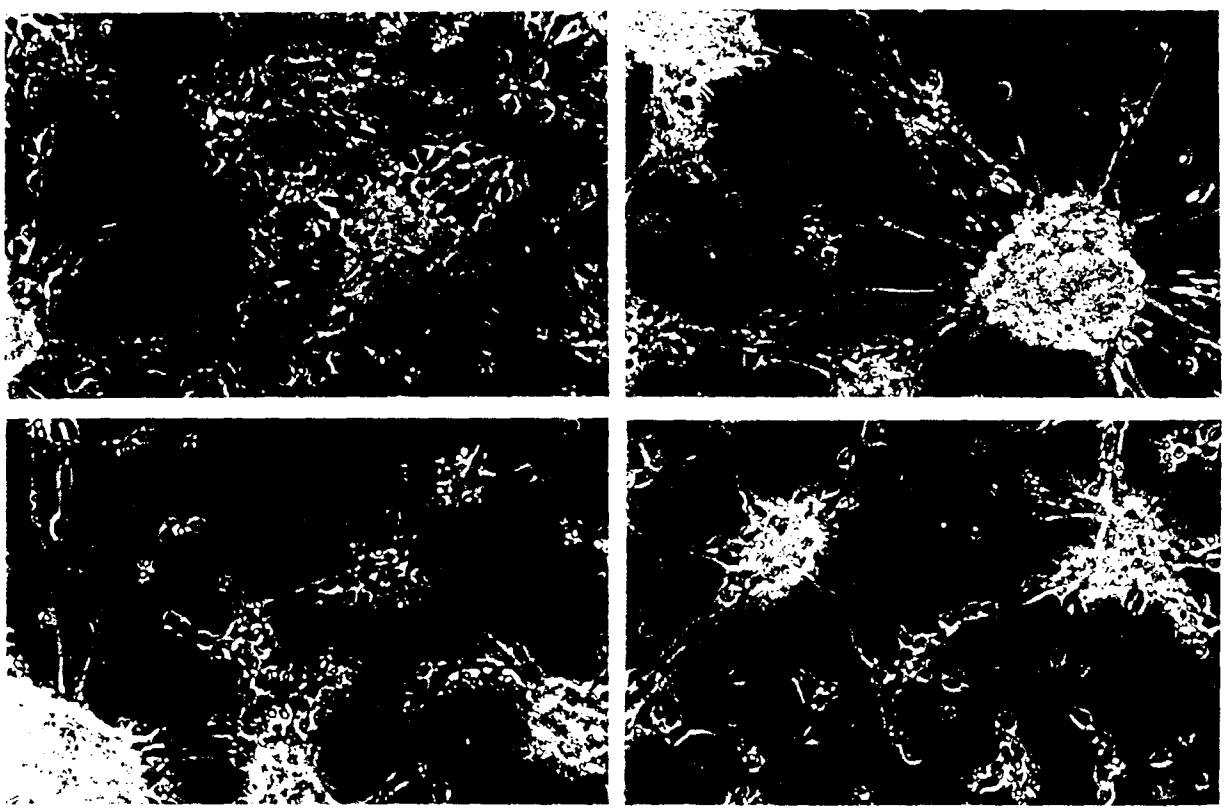


FIG. 1. Effects of DZ and PhB on the growth of neurons from rat embryo cerebral hemispheres cultured in chemically defined medium. **A:** 6-day-old control cultures. **B:** 9-day-old control cultures. **C:** 9-day-old cells cultured for 3 days in SFM containing 10^{-5} *M* DZ. **D:** 9-day-old cells cultured for 3 days in SFM containing 5×10^{-4} *M* PhB. Phase contrast, ×230.

TABLE 1. *Effect of DZ or PhB on cellular morphology*

Treatment	Score (mean ± SD)			
	Cellular aggregates	Neuronal processes	Neuronal cells	Glial cells
Control, 6 days	2.8 ± 0.3	4.8 ± 0.2	4.9 ± 0.1	0.1 ± 0.3
10^{-5} *M* DZ	2.2 ± 0.4	3.3 ± 1.1[a]	4.9 ± 0.2	0.1 ± 0.3
5×10^{-4} *M* PhB	2.1 ± 0.6	2.5 ± 1.3[a]	4.9 ± 0.1	0.1 ± 0.3
Control, 9 days	4.8 ± 0.2	4.9 ± 0.1	4.8 ± 0.4	0.3 ± 0.3
10^{-5} *M* DZ post-withdrawal	3.3 ± 0.7[a]	3.8 ± 0.6[a]	5.0 ± 0.0	0.2 ± 0.3
5×10^{-4} *M* PhB post-withdrawal	2.9 ± 1.0[a]	2.6 ± 0.9[a]	4.7 ± 0.3	0.3 ± 0.5

Three-day-old cultures were transferred into SFM containing DZ (10^{-5} *M*) or PhB (5×10^{-4} *M*) for 3 days. Morphological parameters were scored using a 0–5 scale either at the end of the pharmacological treatment or 3 days after drug removal. Data were obtained from four separate experiments.
[a] Statistically significant difference from control, $p < 0.01$ (Student's *t* test).

When treated between day 3 and day 6 with DZ (10^{-5} *M*) or PhB (5×10^{-4} *M*), the cells exhibited a significant decrease in the 2-DG transport, especially for incubation periods longer than 5 min. Such effects were more pronounced in the presence of PhB, as shown in Fig. 2. The inhibition of 2-DG uptake was obviously the same, whether the cultures had been treated for 3 days by the drugs since day 3 or since day 6 (Figs. 2 and 3).

Table 2 shows that the accumulation of radioactivity after 20 min incubation with 1 m*M* [^{3}H]2-DG was decreased in the presence of any concentration higher than 5×10^{-6} *M* for DZ and higher than 10^{-4} *M* for PhB. Such effects were associated with a decrease in protein contents, enhancing the 2-DG transport alteration when comparing data per dish to each other. These results are in accordance with morphological observations.

The specific uptake of 2-DG in cultured neurons was also measured 3 days after the elimination of the tested drug from the culture medium (Table 3). Under these conditions, DZ (10^{-5} *M*) or PhB (5×10^{-4} *M*) had no significant effect on the initial rate of 2-DG uptake (2- and 5-min pulse) and only slightly

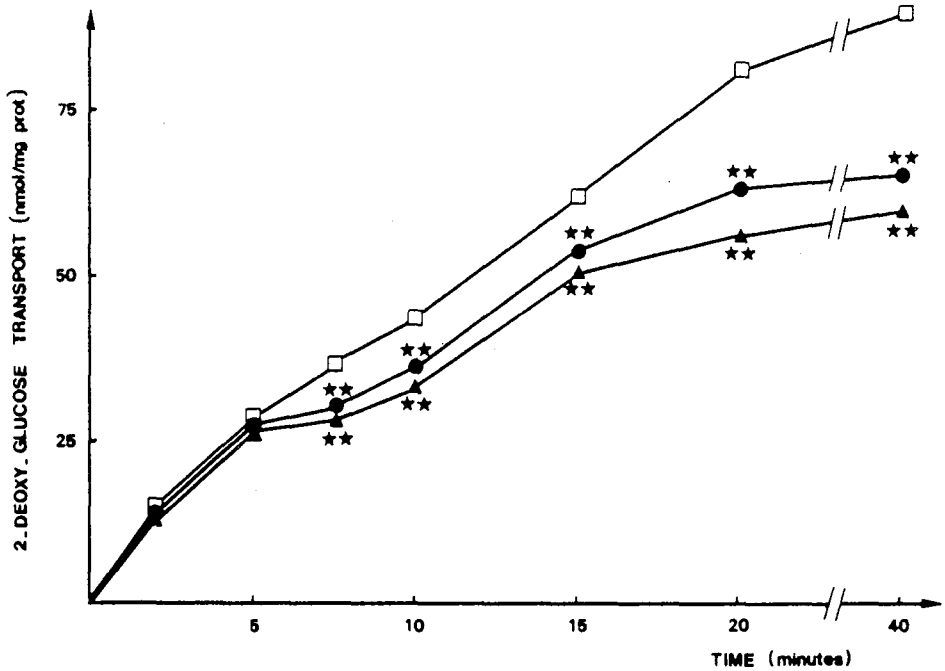


FIG. 2. Effects of a 3-day treatment with DZ (10^{-5} *M*) or PhB (5×10^{-4} *M*) on the specific transport of [^{3}H]2-DG in 6-day-old neurons in culture. Three-day-old cultures grown in SSM in 35-mm Petri dishes were incubated for a further 3 days in SFM in the absence (□) or in the presence of 10^{-5} *M* DZ (●) or 5×10^{-4} *M* PhB (▲). At the end of the pharmacological treatment, specific [^{3}H]2-DG uptake was determined as a function of time, as described in Materials and Methods. Each point is the average of three to five cultures. Maximal SD was ±12%. **Statistically significant difference from control using Student's *t* test, $p < 0.01$.

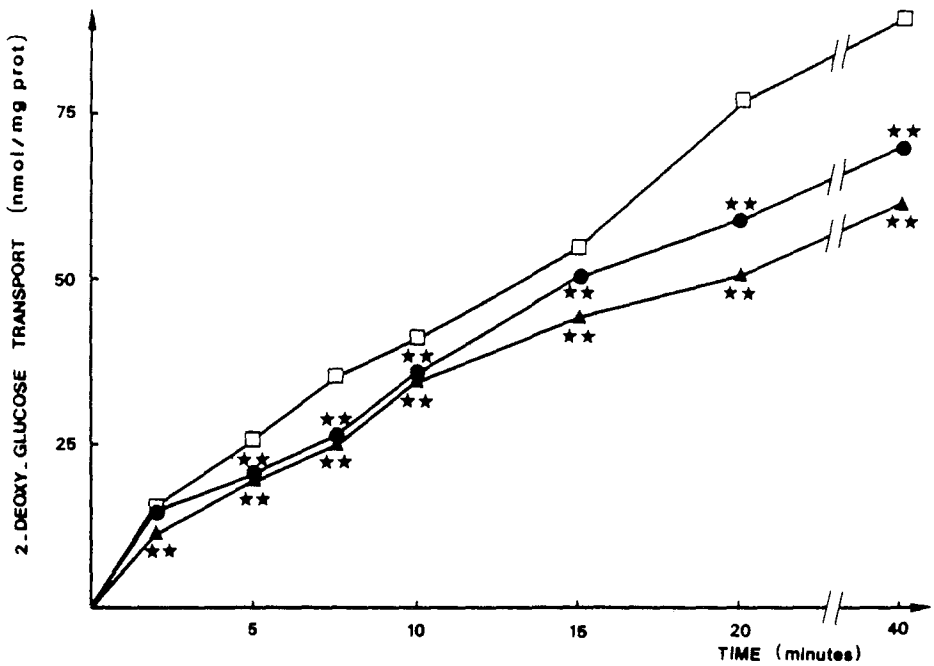


FIG. 3. Effects of a 3-day treatment with diazepam (10^{-5} *M*) or phenobarbital (5×10^{-4} *M*) on the specific transport of [^{3}H]DG in 9-day-old neurons in culture. Three-day-old cultures grown in SSM were transferred to SFM for 3 days. Then, the medium was replaced with SFM with 10^{-5} *M* DZ (●) or 5×10^{-4} *M* PhB (▲) or without drug (□) and the cells were incubated until day 9. At the end of the pharmacological treatment, specific [^{3}H]2-DG uptake was determined as a function of time, as described in Materials and Methods. Each point is the average of three or four cultures. Maximal SD was ±14.5%. **Statistically significant difference from control using Student's *t* test, $p < 0.01$.

affected the equilibrium levels of 2-DG uptake (20-min pulse), indicating a recovery in the glucose transport process, especially after DZ treatment.

TABLE 2. *Effect of DZ or PhB on protein content and [^{3}H]2-DG transport in 6-day-old neurons in culture*

	Protein (μg/dish)	[^{3}H]2-DG uptake (nmol/20 min/mg protein)	Inhibition in 2-DG transport (percent per dish)
Control (SFM)	159.3 ± 17.6	78.9 ± 2.3	—
SFM + vehicle	162.0 ± 12.1	78.3 ± 1.4	—
5×10^{-6} *M* DZ	157.0 ± 11.3	76.4 ± 3.8	—
10^{-5} *M* DZ	135.6 ± 19.7[a]	69.3 ± 5.6[b]	25.6
10^{-4} *M* DZ	119.6 ± 18.3[b]	47.5 ± 9.8[b]	54.8
10^{-4} *M* PhB	153.1 ± 11.2	74.7 ± 4.2	—
5×10^{-4} *M* PhB	128.4 ± 15.6[b]	57.2 ± 2.8[b]	41.8
10^{-3} *M* PhB	110.7 ± 22.2[b]	42.9 ± 5.3[b]	62.4

Cells were allowed to grow in 5% SSM for 3 days after seeding. They were then transferred to SFM (control) for a further 3-day period or SFM containing DZ or PhB at various concentrations. Specific 2-DG uptake was measured at the end of the treatment period as described in Materials and Methods. Each value (±SD) was obtained from three or four separate experiments.

Significant difference from control using Student's *t* test: [a]$p < 0.05$; [b]$p < 0.01$.

L-Leucine and uridine incorporation

As shown in Table 4, both DZ (10^{-5} *M*) and PhB (5×10^{-4} *M*) altered the total uptake of [^{14}C]leucine (TCA-soluble incorporation) by the cells, as well as the accumulation of radiolabeled leucine into the acid-insoluble pool, suggesting a decrease of protein

TABLE 3. *Effect of 3-day post-treatment with DZ (10^{-5} M) or PhB (5×10^{-4} M) on specific [^{3}H]2-DG uptake in 9-day-old neurons in culture*

	Specific [^{3}H]2-DG transport (nmol/mg protein)		
Conditions	2-min pulse	5-min pulse	20-min pulse
SFM	14.4 ± 0.4	28.3 ± 1.8	78.9 ± 3.4
SFM + vehicle	14.1 ± 0.5	28.6 ± 2.0	77.2 ± 0.8
SFM + DZ (10^{-5} *M*)	14.2 ± 0.7	29.2 ± 2.4	74.5 ± 2.5[a]
SFM + PhB (5×10^{-4} *M*)	13.4 ± 0.8	27.8 ± 3.7	66.5 ± 7.0[b]

Three days after seeding, cultures were transferred to SFM in the presence or in the absence of the tested drug for a further 3 days. On day 6, the culture medium was discarded and replaced with standard SFM. The cells were assayed for 2-DG uptake on day 9. Detailed procedure is given in Materials and Methods. The values are means ± SD and were obtained from four separate experiments.

Significant difference from control value: [a]$p < 0.05$; [b]$p < 0.01$ (Student's *t* test).

TABLE 4. *Effects of DZ (10^{-5} M) or PhB (5×10^{-4} M) on protein and RNA labeling after incubation of cultures with [^{14}C]leucine or [^{14}C]uridine*

	[^{14}C]Leucine (dpm/mg protein × 10^{-3})		[^{14}C]Uridine (dpm/mg protein × 10^{-4})	
	TCA-soluble	TCA-insoluble	TCA-soluble	TCA-insoluble
Control (SFM)	467.5 ± 25.8	777.8 ± 44.4	277.3 ± 36.6	684.0 ± 47.5
DZ (10^{-5} *M*)	426.9 ± 28.3[a]	633.4 ± 41.6[a]	266.1 ± 30.1	633.7 ± 50.8[a]
PhB (5×10^{-4} *M*)	411.6 ± 28.4[a]	606.3 ± 53.5[a]	259.2 ± 24.9	609.7 ± 47.4[a]

Five-day-old cultures grown in SFM and pharmacologically treated since day 3 with DZ or PhB were incubated with the drug in the presence of [^{14}C]leucine (for 24 h) or [^{14}C]uridine (for 48 h) and then processed for determination of acid-soluble and acid-insoluble radioactivity. Detailed experimental conditions are described in the text. Values are means ± SD of three or four cultures.

[a] Statistically significant differences as compared to control cultures were established by using Student's *t* test ($p < 0.01$).

synthesis in the cultured neurons (18 and 22% for DZ and PhB, respectively). On the other hand, DZ and PhB did not affect the accumulation of radioactive uridine in TCA-soluble pool. By contrast, these drugs were able to reduce significantly the incorporation of [^{14}C]uridine into the acid-insoluble compartment.

As for 2-DG transport, the effects of PhB (5×10^{-4} *M*) on [^{14}C]leucine and [^{14}C]uridine incorporation were more evident than those of DZ (10^{-5} *M*).

DISCUSSION

The present study shows that commonly used drugs such as DZ or PhB, when added at clinically relevant concentrations (MacDonald, 1984), might affect, at least temporarily, the morphological growth and the biochemical development of cultured neurons grown in chemically defined medium.

Benzodiazepines and barbiturates are structurally distinct classes of drugs that are used clinically for their capacity to depress CNS excitability. Both types of drugs have anxiolytic, sedative, and anticonvulsant properties (Harvey, 1980). Prenatal exposure to these drugs might lead to long-term alteration in brain structure or function in humans (Hill, 1973; Dalessio, 1985) as well as in rodents (Kellogg et al., 1980; Fishman and Yanai, 1983; Frieder and Grimm, 1985).

In vivo, the introduction of one single environmental change (e.g., administration of a drug during pregnancy) may affect different metabolic pathways. Mammalian neurons in culture provide a suitable model for neurotoxicity studies, in contrast to the complex interactions existing in the brain in situ. The culture of cells under serum-free conditions allows the definition of the exogenous factors required for their survival and development in vitro (Ahmed et al., 1983). Furthermore, it was necessary to use serum-free medium in the present study, since the drugs used are able to bind to albumin.

The addition of DZ (10^{-5} *M*) or PhB (5×10^{-4} *M*) to the culture medium for 3 days induced noticeable changes in neuron morphology, such as a less abundant neuritic arborization, particularly when the exposure was early. Concomitantly, a significant decrease in specific uptake of [^{3}H]2-DG was observed. This hexose analog uses the same transport system as glucose but accumulates in the cell rather than being utilized by numerous cellular pathways. Since the transport of glucose is potentially rate limiting for brain glucose utilization, as pointed out by Pardridge (1983), such a decrease in the 2-DG uptake indicates a reduced rate of cellular metabolism. PhB (5×10^{-4} *M*) induced a 25–30% inhibition of 2-DG uptake, whereas DZ (10^{-5} *M*) reduced the hexose transport by 15–20%. Although kinetic parameters have not been studied in detail, DZ and PhB seemed to affect the total 2-DG transport, as shown by a reduced steady-state level rather than the initial rate of uptake. Furthermore, the effects of each drug were of the same order of magnitude whether the cultured neurons have been treated between day 3 and day 6 or from day 6 to day 9. However, the study of 2-DG uptake in neuronal cells, as measured 3 days after the tested drug was removed from the surrounding medium, showed that DZ or PhB have only transient effects on neuronal glucose transport since recovery in 2-DG uptake was noticed.

Especially in the presence of PhB (5×10^{-4} *M*), it was shown that inhibition of 2-DG uptake was always associated with a significant decrease in protein content, as compared to control cultures. Such a phenomenon might reflect a loss in the cell number and/or a disturbance in protein synthesis. Cellular damage induced by barbiturate treatment in mice has been previously reported, showing that PhB has the capacity to alter neuronal differentiation as well as to destroy already formed neurons (Yanai et al., 1979; Yanai and Iser, 1981; Yanai, 1984). Early exposure to barbiturate has been shown to affect protein synthesis (Zemp and Middaugh, 1975; Schain and Watanabe, 1975). So, our observations were extended by the

study of the effects of DZ and PhB on the incorporation of radioactive L-leucine and uridine into culture acid-soluble and acid-insoluble pools. Results showed that both DZ (10^{-5} *M*) and PhB (5×10^{-4} *M*) decreased the overall protein synthesis by 15–20%. Regarding RNA labeling, the drugs affected only the incorporation of [^{14}C]uridine into the acid-insoluble compartment, indicating that the decrease of RNA labeling, as compared to control cells, is not the consequence of an altered accumulation of uridine in the acid-soluble pool.

By contrast to the present study, Culver and Vernadakis (1979) reported that the in vitro administration of PhB at concentrations up to 10^{-3} *M*, for a period of 3 days, did not noticeably alter histological parameters or protein synthesis in brain cell cultures. One possible explanation is that these authors used chick embryonic neurons and glia in cell culture grown in 20% serum-supplemented medium, as a model. The neurotoxic effects of PhB might be preferentially higher in neurons than in glia cells, as previously suggested for diphenylhydantoin, another anticonvulsant drug (Yanagihara and Hamberger, 1971). Consequently, PhB-induced alterations in neurons might be hidden in these mixed brain cell cultures because of the high number of glia cells serving to dilute the drug effect. Moreover, the presence of a relatively high concentration of serum in the culture medium could protect the cells, at least temporarily, against drug-induced cell disturbance.

In conclusion, the results obtained in the present study indicate that, using a culture of rat embryo CNS neurons, it was possible to demonstrate that DZ and PhB may exert a direct effect on the normal growth of neurons. The presence of these drugs in the environmental medium of the cells is correlated to morphological modifications, lowering of metabolic activity, decrease in the glucose transport, the most important energy source for the brain, and even alteration in cell survival. Although the effects of both drugs on cellular metabolism appeared to be reversible, as shown by recovery in glucose uptake, some morphological alterations (i.e., reduced neuronal processes) could be observed at least 3 days after the drug removal. That observation suggests some long-lasting impairment in cellular communication following exposure to DZ or PhB at clinical concentrations and it might be related to their effects on behavior, long after the actual period of exposure. These results are in accordance with previous reports (Frieder and Grimm, 1985; Fishman and Yanai, 1983) and will require more extensive investigation using other drugs in order to study the specificity of the drugs' action upon cell growth.

Acknowledgment: The authors are grateful to Dr. P. J. Marangos for reading the manuscript and are indebted to S. Aguerre and T. Colas for technical assistance and to P. Michel for animal maintenance. Thanks are due to L. Gouret and T. DiBari for excellent editorial assistance.

REFERENCES

Ahmed Z., Walker P. S., and Fellows R. E. (1983) Properties of neurons from dissociated fetal rat brain in serum-free culture. *J. Neurosci.* **3**, 2448–2462.

Borg J., Spitz B., Hamel G., and Mark J. (1985) Selective culture of neurons from rat cerebral cortex: morphological characterization, glutamate uptake and related enzymes during maturation in various culture media. *Dev. Brain Res.* **18**, 37–49.

Bottenstein J. F. and Sato G. (1979) Growth of a neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 514–517.

Culver B. and Vernadakis A. (1979) Effects of anticonvulsant drugs on chick embryonic neurons and glia in cell culture. *Dev. Neurosci.* **2**, 74–85.

Dalessio D. J. (1985) Seizure disorders and pregnancy. *N. Engl. J. Med.* **312**, 555–563.

Daval J. L., Louis J. C., Gerard M. J., and Vincendon G. (1983) Influence of adrenocorticotropic hormone on the growth of isolated neurons in culture. *Neurosci. Lett.* **36**, 299–304.

Faivre-Baumann A., Rosenbaum E., Puymirat J., Grouselle D., and Tixier-Vidal A. (1981) Differentiation of fetal mouse hypothalamic cells in serum-free medium. *Dev. Neurosci.* **4**, 118–129.

Fishman R. H. B. and Yanai J. (1983) Long-lasting effects of early barbiturates on central nervous system and behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **7**, 19–28.

Forfar J. O. and Nelson M. N. (1973) Epidemiology of drugs taken by pregnant women: drugs that may affect the fetus adversely. *Clin. Pharmacol. Ther.* **14**, 632–642.

Frieder B. and Grimm V. E. (1985) Some long-lasting neurochemical effects of prenatal or early postnatal exposure to diazepam. *J. Neurochem.* **45**, 37–42.

Garattini S., Marcucci F., and Mussini E. (1977) The metabolism and pharmacokinetics of selected benzodiazepines. in *Psychotherapeutic Drugs* (Usdin E. and Forrest I. F., eds), pp. 1030–1087. Marcel Dekker, New York.

Harvey S. C. (1980) Hypnotics and sedatives, in *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Gilman A. G., Goodman L., and Gilman A., eds), pp. 339–375. Macmillan, New York.

Hill R. M. (1973) Teratogenesis and antiepileptic drugs. *N. Engl. J. Med.* **289**, 1089–1090.

Kellogg C., Tervo D., Ison J., Parisi T., and Miller R. K. (1980) Prenatal exposure to diazepam alters behavioral development in rats. *Science* **207**, 205–207.

MacDonald R. L. (1984) Anticonvulsant and convulsant drug actions on vertebrate neurones in primary dissociated cell culture. in *Electrophysiology of Epilepsy* (Schwartzkroin P. A. and Wheal H. V., eds), pp. 353–387. Academic Press, London.

MacDonald R. L. and McLean M. J. (1986) Anticonvulsant drugs: mechanisms of action, in *Advances in Neurology, Vol. 44* (Delgado-Escueta A. V., Ward A. A., Woodbury D. M., and Porter R. J., eds). Raven Press, New York.

Miller G. L. (1959) Protein determination for large numbers of samples. *Anal. Chem.* **31**, 964–966.

Pettmann B., Louis J. C., and Sensenbrenner M. (1979) Morphological and biochemical maturation of neurones cultured in the absence of glial cells. *Nature* **281**, 378–380.

Pardridge W. M. (1983) Brain metabolism: a perspective from the blood–brain barrier. *J. Physiol. Rev.* **63**, 1481–1535.

Schain R. J. and Watanabe K. (1975) Effect of chronic phenobarbital administration upon brain growth of the infant rat. *Exp. Neurol.* **47**, 509–515.

Schulz D. W. and MacDonald R. L. (1981) Barbiturate enhancement of GABA-mediated inhibition and activation of chloride

ion conductance: correlation with anticonvulsant and anesthetic action. *Brain Res.* **209**, 177–188.

Speidel B. D. and Meadow S. R. (1972) Maternal epilepsy and abnormalities of the fetus or newborn. *Lancet* ii, 839–843.

Wallace S. J. (1984) Studies on the effects of anticonvulsant drugs on the developing human brain, in *Neurobehavioral Toxicology* (Yanai J., ed), pp. 133–151. Elsevier, Amsterdam.

Yanagihara T. and Hamberger A. (1971) Effect of diphenylhydantoin on protein metabolism in neuron and neuroglial fractions of central nervous tissue. *Exp. Neurol.* **32**, 152–162.

Yanai J. (1984) An animal model for the effect of barbiturate on the development of the central nervous system, in *Neurobehavioral Teratology* (Yanai J., ed), pp. 111–132. Elsevier, Amsterdam.

Yanai J. and Iser C. (1981) Stereologic study on Purkinje cells in mice following early exposure to phenobarbital. *Exp. Neurol.* **74**, 707–716.

Yanai J., Rosselli-Austin L., and Tiakoff B. (1979) Neuronal deficits in mice following prenatal exposure to phenobarbital. *Exp. Neurol.* **64**, 237–244.

Yavin E. and Yavin Z. (1974) Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemispheres on poly-lysine coated surface. *J. Cell Biol.* **62**, 540–546.

Zagon I. S. and Lasher R. S. (1977) A modification of the Bodian technique for embedded, frozen and cultured nervous tissue. *Trans. Am. Microscop. Soc.* **96**, [illegible]–96.

Zemp J. W. and Middaugh L. D. (1975) Some effects of prenatal exposure to α-amphetamine sulfate and phenobarbital on developmental neurochemistry and on behavior. *Addict. Dis.* **2**, 307–331.

NOM DE L'ETUDIANT : Madame PEREIRA DE VASCONCELOS

NATURE DE LA THESE : Doctorat de l'Université de NANCY I en neurosciences

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

NANCY, le 15 NOV. 1989 n° 2193

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I

M. BOUILLANGE

UNIVERSITÉ DE NANCY I
10 NOV. 89
002323
COURRIER ARRIVÉE
SCOLARITÉ

Une exposition chronique précoce au phénobarbital chez le rat induit un déséquilibre de la balance énergétique cérébrale : la diminution de l'utilisation du glucose comme substrat de la biosynthèse des acides aminés cérébraux s'accompagne d'une dépression à court terme de l'utilisation de glucose, mesurée par autoradiographie quantitative, dans l'ensemble des structures cérébrales étudiées sauf à 17 jours. A long terme, la réduction de l'utilisation cérébrale de glucose persiste dans bon nombre de structures et s'accompagne de perturbations du comportement et des capacités d'apprentissage spatial en labyrinthe. De plus, le PhB affecte la croissance et diminue le métabolisme de neurones d'embryons de rats en culture.

Mots clés : phénobarbital ; traitement chronique ; métabolisme énergétique cérébral ; développement postnatal ; comportement ; culture de neurones ; rat.